

# **Endocytose und Exocytose in *Saccharomyces cerevisiae***

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Bayram Cucu

aus Siverek

1. Referent/ Referentin: Prof. Dr. Adam Bertl

2. Referent/Referentin: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Darmstadt 2018

D 17

Dipl. Biol. Bayram Cucu: Endocytose und Exocytose in *Saccharomyces cerevisiae*

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung auf TUpriints: 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2018

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Biologische Membranen und Membranmodelle .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Funktion biologischer Membranen .....	4
2.1.2. Aufbau und chemische Bestandteile biologischer Membranen.....	5
<b>2.2. Membrantransport.....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Endocytose und Exocytose in Hefe .....	7
2.2.1.1. Clathrin-vermittelte Endocytose (CVE) .....	9
2.2.1.2. Clathrin-unabhängige Endocytose .....	11
2.2.1.3. Exocytose .....	12
<b>2.3. Elektrische Eigenschaften biologischer Membranen .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Messung von Membranspannung und Membranleitfähigkeit .....	14
2.3.2. Messung von Membrankapazität .....	15
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Hefestämme .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Plasmide .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Puffer und Medien .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Tests auf K1 Killertoxin-Sensitivität.....</b>	<b>21</b>
3.4.1. Isolierung von K1 Killertoxin aus dem Hefestamm X3.....	21
3.4.2. Überprüfung der Killer-Sensitivität der Hefestämme durch Hemmhoftests .....	21
<b>3.5. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	22
3.5.2. Plasmidisolierung aus Hefe .....	22
3.5.3. Linearisierung von Plasmiden .....	22
3.5.4. Polymerase-Kettenreaktion .....	22
3.5.5. Transformation von <i>E. coli</i> .....	23
3.5.6. Transformation von Hefe .....	24
3.5.7. Herstellung von Protoplasten aus Hefe .....	24
<b>3.6. Protoplastenwachstum .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM).....</b>	<b>25</b>
<b>3.8. Membranmarkierung mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 .....</b>	<b>25</b>
<b>3.9. Fluoreszenzmarkierung der Plasmamembran .....</b>	<b>26</b>
<b>3.10. Elektrophysiologie und Datenanalyse .....</b>	<b>27</b>
3.10.1. Messung von Kapazitätsänderung mit der Patch-Clamp-Technik .....	27
3.10.2. Analyse der Daten aus Kapazitätsmessungen .....	29

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1.	Hefeprotoplasten wachsen	30
4.2.	Endocytose/Exocytose ist in Protoplasten intakt	31
4.3.	Elektrophysiologische Messungen elementarer Ereignisse der Endocytose/Exocytose	34
4.4.	Bedeutung von Clathrin für die Endo-/Exocytose in Hefen	36
4.5.	Clc1p-defiziente Hefen sind immun gegen K1 Killertoxin	42
4.6.	Endocytose und Exocytose wird moduliert durch die Membranfluidität	43
4.6.1.	Modulation durch ungesättigte Fettsäuren in der Membran	43
4.6.2.	Modulation durch Sterolgehalt in der Membran	47
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
5.1.	Wachstum und Oberflächenvergrößerung	51
5.2.	Endo-/Exocytose und Protoplastenwachstum in Clathrin-Deletionsmutanten	53
5.3.	Modulation der Endo-/Exocytose durch die Lipidzusammensetzung	54
5.4.	Die Rolle von Sterolen bei Endocytose und Exocytose	56
5.5.	Hefeprotoplasten als Messsystem	57
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>64</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	64
7.2.	ORF- und Plasmid-Sequenzen, Plasmidkarten	66
7.2.1.	Sequenz und Plasmidkarte von pGREG576	66
7.2.2.	Sequenz und Plasmidkarte von pGREG600	68
7.2.3.	Sequenz von <i>TOK1</i> ( <i>Tandem Pore Outward Rectifying K<sup>+</sup>-Channel 1</i> )	71
7.2.4.	Sequenz von <i>NUP49</i> ( <i>Nuclear Pore 49</i> )	72
7.3.	Eigenanteil an der Arbeit	73
7.4.	Konferenzbeiträge	74
7.5.	Eigene Publikationen	74
7.6.	Lebenslauf	75
7.7.	Danksagung	76
7.8.	Ehrenwörtliche Erklärung	77

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden endocytotische und exocytotische Aktivität in Hefeprotoplasten mit Hilfe der Patch-Clamp Methode untersucht. Eine Variante dieser Methode erlaubt es, Änderungen der Membranfläche wie sie aus individuellen Ereignissen der Vesikelfusion oder Vesikelabschnürung resultieren, als Änderung der Membrankapazität mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung zu untersuchen. Die Kapazitätsmessungen werden dabei an kleinen Membranarealen durchgeführt. Dies erlaubt Einzelereignisse zu registrieren, wobei die Auflösungsgrenze in den hier vorgestellten Messungen im Bereich von etwa 0,1 fF lag. Dies entspricht einer Vesikelgröße von etwa 60 nm und würde damit ausreichen, um die Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikel, die eine Größe von 50 -100 nm aufweisen, gerade noch zu erfassen.

In Protoplasten von Wildtyp Hefezellen konnten exocytotische Ereignisse als Kapazitätserhöhungen mit einer mittleren Größe (Median) von 0,4 fF und endocytotische Ereignisse als Kapazitätserniedrigungen von 0,36 fF gemessen werden. Dies entspricht Durchmessern von 126 nm für sekretorische Vesikel und 120 nm für endocytotische Vesikel.

Hefeprotoplasten wachsen in osmotisch stabilisierendem Puffer mit Glucose als Kohlenstoffquelle kontinuierlich über mehrere Tage, ohne Knospen zu bilden und sich vegetativ zu vermehren. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass in Protoplasten von Wildtypzellen ein leichtes Ungleichgewicht zugunsten exocytotischer Aktivität ( $f_{ex}$ ) gegenüber endocytotischer Aktivität ( $f_{end}$ ) von  $f_{ex}/f_{end} = 1,6$  herrscht.

Dieses leichte Ungleichgewicht war in Clathrin-Deletionsmutanten gestört. Während die Deletion des Gens für die schwere Clathrinkette, *CHC1*, zu einer leichten Inhibierung der Endocytose führte, kam die endocytotische Aktivität in *CLC1*-Deletionsmutanten fast vollständig zum Erliegen. Das Verhältnis  $f_{ex}/f_{end}$  stieg in der *CHC1*-Deletionsmutante auf 2,6 und in der *CLC1*-Deletionsmutante auf 21,0. Dies resultierte in einer Steigerung des Protoplastenwachstums gegenüber Protoplasten aus Wildtypzellen, wobei der positive Effekt auf das Wachstum der Protoplasten aus der *CLC1*-Deletionsmutante deutlich stärker war, als das der Protoplasten aus der *CHC1*-Deletionsmutante.

Offensichtlich ist die endocytotische Aktivität in der Bäckerhefe sehr viel stärker von Clc1p abhängig, als von Chc1p. Der Grund dafür könnte in der Funktion von Clc1p als regulatorisches Element für die Trimerisierung von Chc1p und somit für die Bildung des Clathrinmantels und in seiner Funktion als Bindeglied für die Anheftung von Actin an die

Membran liegen. Actin fungiert als treibende Kraft für die Membraninvagination und Ablösung von endocytotischen Vesikeln.

Neben den Strukturproteinen Clc1p und Chc1p, die das Clathringerüst bilden, konnte die Lipidzusammensetzung der Membran als wichtiger Faktor für die exocytotische und endocytotische Aktivität in der Bäckerhefe identifiziert werden. Um die Rolle von Lipiden bei Endo- und Exocytose zu untersuchen, wurden Hefestämme verwendet, in denen die Expression von Schlüsselenzymen des Lipidstoffwechsels reguliert werden konnte.

Durch Austausch des *P<sub>OLE1</sub>*-Promotors gegen den Methionin-reprimierbaren *P<sub>MET3</sub>*-Promotor war es möglich durch Reprimierung der *OLE1*-Expression den Gehalt an einfach-ungesättigten Fettsäuren in Hefe von 80% auf 25% zu reduzieren. Die Reduzierung des Anteils einfach-ungesättigter Fettsäuren resultiert in einer Verringerung der Membranfluidität und in einer Reduzierung der exocytotischen und endocytotischen Aktivität, wobei der inhibitorische Effekt auf die endocytotische Aktivität stärker war, als auf die exocytotische Aktivität. Durch diese Reduzierung der Membranfluidität wurde 85% der endocytotischen Aktivität gehemmt.

Nicht nur der Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran spielt eine Rolle für endocytotische und exocytotische Aktivität, sondern auch die Dotierung der Membran mit Sterolen, wobei dies in Hefe vorwiegend Ergosterol ist. Hemmung der Ergosterolbiosynthese in einem Hefestamm mit regulierbarer Expression von *ERG9* führte zu einer Halbierung der endocytotischen Aktivität, während dies keinen Einfluss auf die exocytotische Aktivität hatte. Hier stellte sich die Frage, ob die Hemmung der endocytotischen Aktivität auf eine Änderung der Membranfluidität oder auf die Auflösung von Lipid Rafts, die als Orte der Endocytose diskutiert werden, zurückzuführen ist.

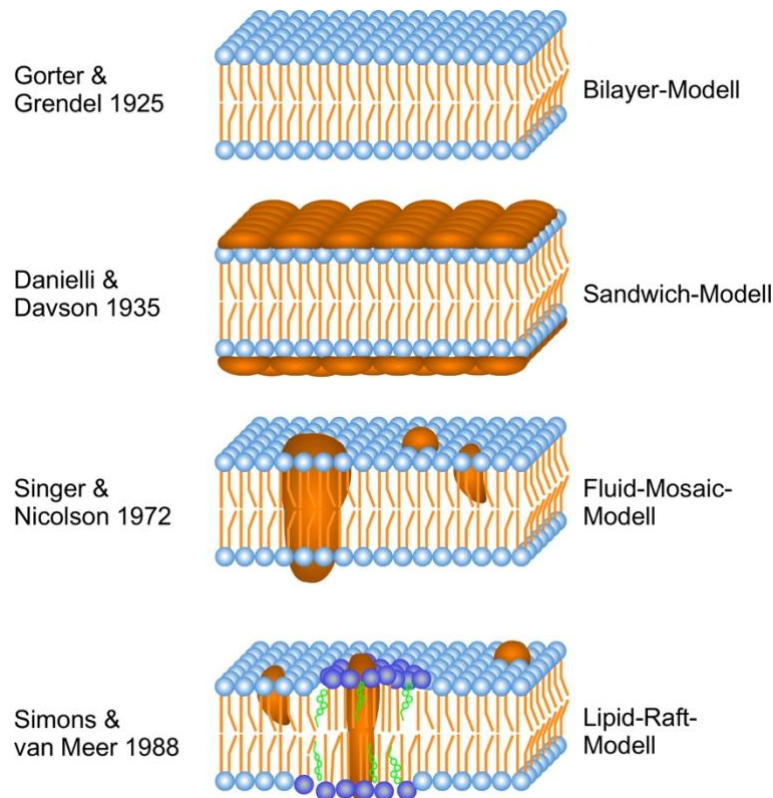
Die in elektrophysiologischen Experimenten gemessenen Änderungen der endocytotischen und exocytotischen Aktivitäten in Abhängigkeit der Lipidkomposition (ungesättigte Fettsäuren und Ergosterol-Gehalt) konnten durch fluoreszenz-optische Experimente bestätigt werden. Dabei wurde die Expression und Plasmamembran-Lokalisation eines GFP-Fusionsproteins (Tok1p-GFP) als Indiz für korrekte Exocytose und die Internalisierung des lipophilen Farbstoffs FM4-64 als Endocytosemarker verwendet.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1. BIOLOGISCHE MEMBRANEN UND MEMBRANMODELLE

Bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts erkannte Henri Dutrochet mit seinen Experimenten zur Osmose in Pflanzenzellen die Bedeutung von semipermeablen Grenzsichten für den Stofftransport an Pflanzenzellen (Dutrochet, 1826). In seiner Arbeit "Osmotische Untersuchungen" sprach Pfeffer erstmals von einer "Plasmahaut", die als periphere Schicht das Protoplasma umgibt und allen lebenden Zellen semipermeable Eigenschaften und osmotisches Verhalten ermöglicht (Pfeffer, 1877). Overton beobachtete, dass neben Wasser und sehr kleinen Molekülen auch fettlöslich Substanzen in die Zellen gelangen können und vermutete daher, dass die Zellhäutchen aus Lipiden bestehen müssten. Dies führte 1895 zu der Formulierung der "Lipidtheorie der Plasmapermeabilität" (Collander, 1933). Das Modell der Phospholipid-Doppelschicht für biologische Membranen geht auf die Arbeiten von Gorter und Grendel, 1925, zurück, die fanden, dass der Phospholipidgehalt von isolierten Membranen aus Erythrozyten ausreicht, um die Zellen mit zwei Phospholipid-Monolayern zu umgeben (Gorter and Grendel, 1925). Dieses Bilayermodell wurde 10 Jahre später zum Sandwich-Modell erweitert, das das Vorkommen eines großen Proteinanteils in biologischen Membranen berücksichtigt. Demnach ist die Phospholipiddoppelschicht beidseitig von einer starren Schicht globulärer Proteine bedeckt (Danielli and Davson, 1935). Dieses Sandwich-Modell von Danielli und Davson hatte jedoch seine Schwächen in der Erklärung vieler physiologischer Phänomene, aber auch die Beschaffenheit von Membranproteinen mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen waren mit dem Sandwich-Modell nicht kompatibel. Ganz anders das Fluid-Mosaic-Modell von Singer und Nicolson (Singer and Nicolson, 1972), das eine biologische Membran als einen mehr oder weniger flüssigen See aus Phospholipiden beschreibt, in dem verschiedene Proteine (integrale und periphere Proteine) eingebettet und lateral beweglich sind (Frye and Edidin, 1970). Integrale Membranproteine können mit ihren polaren Bereichen aus der Membran herausragen und in die wässrige Phase tauchen, während die unpolaren Bereiche der Membranproteine im hydrophoben Inneren der Membran verborgen sind.

Allerdings zeigte sich, dass biologische Membranen nicht über eine homogene Phospholipiddoppelschicht mit eingelagerten, mehr oder weniger frei beweglichen Proteinen verfügen, sondern durchaus eine laterale Kompartimentierung aufweisen können. Dies wurde durch Simons und van Meer (Simons and van Meer, 1988) als Lipid-Raft-Modell vorgestellt. Dabei geht man davon aus, dass in biologischen Membranen Mikrokompartimente existieren, die reich an Sterolen und Sphingolipiden sind, und in denen sich bestimmte Membranproteine bevorzugt aufhalten.



**Abbildung 1: Membranmodelle im Wandel der Zeit**

Schematische Darstellung verschiedener Membranmodelle, beginnend mit dem Bilayermodell (Gorter and Grendel, 1925) bis zum Lipid-Raft-Modell (Simons and van Meer, 1988). Die Phospholipide sind als blaue Kugeln (hydrophiler Kopf) mit jeweils zwei orangenen Anhängseln (hydrophobe Schwänze; Fettsäuren) dargestellt. Im Sandwich-Modell liegt auf beiden Seiten des Lipid-Bilayers jeweils eine Proteinschicht (braune Strukturen) auf. Die Proteine sind im Fluid-Mosaic-Modell teilweise in die Lipid-Doppelschicht inseriert oder diese durchspannend, im Lipid-Raft-Modell teilweise in speziellen, sterolreichen Arealen (dunkelblaue Bereiche mit Sterolen in grün) angereichert.

### 2.1.1. FUNKTION BIOLOGISCHER MEMBRANEN

Biologische Membranen bilden aus energetischen Gründen eine kontinuierliche, ununterbrochene Schicht und somit automatisch abgegrenzte Reaktionsräume wie die Zelle oder die Kompartimente innerhalb einer Zelle. Damit haben biologische Membranen grundsätzlich zwei Funktionen.

- Durch ihre Eigenschaft der Semi-Permeabilität bilden sie eine Diffusionsbarriere (zumindest für bestimmte Stoffe) und ermöglichen so das Aufrechterhalten eines Konzentrationsgefälles zwischen dem Zellinneren (Protoplasma) und der Umgebung, sowie zwischen verschiedenen Membran-umschlossenen Zellkompartimenten.



Dies gewährleistet, dass die lebenswichtigen und unter enormem Energieaufwand erzeugten Makromoleküle der Zelle (Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide) nicht verloren gehen. Durch den (fast) ungehinderten Durchtritt von Wasser (und Gasen wie CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) ist eine schnelle Anpassung der Zelle auf unterschiedliche osmotische Umweltbedingungen dennoch gewährleistet.

- Biologische Membranen erlauben und regulieren den Austausch von Substrat, Energie und Information zwischen den Zellkompartimenten (Zelle und Umgebung, sowie intrazelluläre Kompartimente untereinander).

Somit muss das Konzept einer semipermeablen Membran, die durchlässig ist für das Lösungsmittel (Wasser), aber undurchlässig für die darin gelösten Stoffe, korrigiert werden. Biologische Membranen sind eher selektiv permeabel, d.h. sie sind durchlässig für ganz bestimmte Stoffe, wie z.B. Wasser, bestimmte Ionen, Zucker etc., und undurchlässig für andere Stoffe. Diese selektive Permeabilität resultiert aus der Dotierung der jeweiligen Membran mit spezifischen Proteinen, die die Funktion der Membran maßgeblich beeinflusst. Neben den membranständigen Proteinen, die ihre Hauptfunktionen in Stofftransport, Signalübertragung, Zell-Zell-Verbindungen und Erkennung, sowie Verankerung am Cytoskelett und an extrazellulären Strukturen haben, spielen für die Zellerkennung auch membrangebundene Kohlenhydrate eine wichtige Rolle (Glykoproteine und Glykolipide).

Durch Einstülpungen von Membrane können sehr vorteilhafte Oberflächen/Volumen-Verhältnisse erreicht werden, wie zum Beispiel bei den inneren Membranen der Chloroplasten und Mitochondrien, die mit einer großen Oberfläche für Transportprozesse und einem kleinen Volumen ideale Voraussetzungen (große Konzentrationsgefälle der transportierten Ionen = große Triebkraft) für chemiosmotische Vorgänge schaffen. Oberflächenvergrößerungen durch Einstülpungen von Membranen können auch als Reservoir für schnelle, osmotisch bedingte Zellexpansion dienen, wie dies für Eisosomen in der Bäckerhefe postuliert wird (Kabeche *et al.*, 2015).

### **2.1.2. AUFBAU UND CHEMISCHE BESTANDTEILE BIOLOGISCHER MEMBRANEN**

Die Lipidphase der Membranen von Hefen besteht primär aus Glycerophospholipiden, Cardiolipinen, Ergosterol und Sphingolipiden (Gardocki *et al.*, 2005; Gaspar *et al.*, 2007; Carman and Han, 2009). Phospholipide sind die primären Strukturen der Membran und lebensnotwenig für die Zelle. Aufgrund der amphipathischen Natur der Phospholipide, können diese sich spontan zu Lipiddoppelschichten (Membran) zusammenlagern. In biologischen Membranen sind verschiedenste Membranproteine eingebettet, welche z.B. den Nährstoff- und Ionentransport, die Homöostase sowie die Weiterleitung von externen

Signalen regulieren. Darüber hinaus agieren in Hefen verschiedene Klassen von Lipiden als second messenger in einer Reihe von Signalkaskaden (Gardocki *et al.*, 2005; Yetukuri *et al.*, 2007). In Hefe stellen Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserine den Hauptteil der Phospholipide dar (van der Rest *et al.*, 1995; Carman and Han, 2009). Je nach Membrantyp können die Anteile dieser Bestandteile stark variieren und verleihen dem Membrantyp spezifische Eigenschaften. Die Ladung der Kopfgruppen dieser Moleküle beeinflusst neben dem Membranpotential auch die Aktivität Membran-assoziiierter Proteine. Ein erhöhter Anteil von Phospholipiden mit großem Un sättigungsgrad führt zu einer höheren Fluidität der Membran. Im Gegensatz dazu hat ein erhöhter Anteil von Sterolen eine Erniedrigung der Fluidität zur Folge, welches zu einer Versteifung der Membran beiträgt (van der Rest *et al.*, 1995). Dabei ist jedoch zu bemerken, dass die Einlagerung von Sterolen sowohl zu einer Erhöhung, als auch zu einer Erniedrigung der Fluidität führen kann. Die Fluidität einer Membran ist sehr stark von der Temperatur abhängig und kann temperaturabhängig verschiedene Zustände (Phasen) annehmen. Eine Membran ist bei geringen Temperaturen eher sehr stark geordnet mit einer geringen Fluidität (*solid-ordered phase*) und kann bei Temperaturerhöhung in einen ungeordneten Zustand mit hoher Fluidität (*liquid-disordered phase*) übergehen. Die Übergangstemperatur ist charakteristisch für eine Membran und hängt sehr stark von der Lipidzusammensetzung dieser Membran ab. Membranen mit längere Fettsäureketten oder einem höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren haben eine höhere Übergangstemperatur. Die Einlagerung von Sterolen führt unterhalb der Übergangstemperatur (also in "*solid-ordered phase*" Membranen) zu einer Erhöhung, oberhalb der Übergangstemperatur (in "*liquid-disordered phase*" Membranen) jedoch zu einer Erniedrigung der Fluidität. Organismen können die Lipidzusammensetzung einer Membran durch Einlagerung oder Entfernen von Sterolen und ungesättigten Fettsäuren modulieren und an veränderte Umweltbedingungen (Temperatur) anpassen, um die richtige Membranfluidität aufrechtzuerhalten. So passen sich beispielsweise winterharte, frostresistente Pflanzen durch vermehrte Einlagerung von ungesättigten Fettsäuren der Kälte an (Routaboul *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2014). Die Plasmamembran von *S. cerevisiae* hat einen höheren Anteil an Sphingolipiden und Sterolen als die Membran des Endoplasmatischen Retikulums, was wahrscheinlich zum Schutz vor mechanischen Stress dient. Im Gegensatz dazu findet sich im Endoplasmatischen Retikulum ein erhöhter Anteil von Phospholipiden, welcher essentiell für Prozesse der Proteinsynthese bzw. Signaltransduktion ist (van Meer *et al.*, 2008).

In biologischen Membranen sind die Lipidmoleküle nicht homogen verteilt. Vielmehr existieren Membranbereiche mit besonderer Lipidzusammensetzung. Insbesondere Sterole und Sphingolipide neigen dazu, sich in solchen Membranbereichen anzureichern

und Membranmikrodomänen zu bilden. Manche Proteine sammeln sich in solchen Bereichen an, während andere dort besonders selten zu finden sind. Dies könnte durchaus mit der Membrandicke zusammenhängen. So hängt zwar die Membrandicke generell von der Lipidzusammensetzung ab und beträgt etwa 4 - 5 nm, kann aber durch die Dotierung mit Sterolen um bis zu 20% (1 nm) vergrößert werden (Li *et al.*, 2012). In biologischen Membranen treten solche Sterol- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen, sogenannte Lipid-Rafts, häufig assoziiert mit charakteristischen Membranproteinen auf. So sind im Plasmalemma der Bäckerhefe die sich ausschließenden Membrankompartimente MCC ("*Membrane Compartment of CAN1*") und MCP ("*Membrane Compartment of PMA1*"), die charakteristisch für die Argininpermease Can1p bzw. die Protonen-ATPase Pma1p sind (Malinsky *et al.*, 2010), sowie MCT ("*Membrane Compartment containing TORC2*") beschrieben (Berchtold and Walther, 2009).

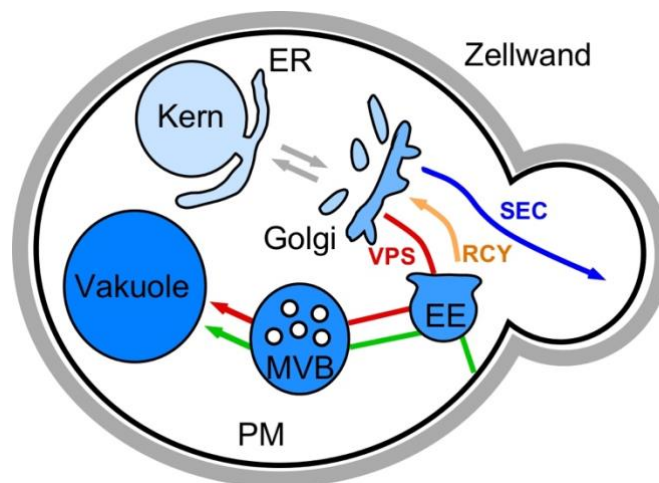
Lipid Rafts spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Lipidsortierung, Proteinsortierung, sowie dem intrazellulären Transport von Lipiden und Proteinen (van Meer, 1989; Bagnat *et al.*, 2001). Die Bedeutung der Membranmikrodomänen für die Stabilität bzw. das Recycling von Membranproteinen wird jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits wurde in Hefe gezeigt, dass Mutationen in Proteinen, die für die Struktur der Eisosomen (=MCC) wichtig sind, einen Endocytose-Phänotyp verursachen und somit Eisosomen als die Orte der Endocytose angesehen werden (Walther *et al.*, 2006), andererseits wurde aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation von Endocytose-Markerproteinen und der MCC-Marker postuliert, dass die Membranproteine im MCC vor endocytotischem Abbau geschützt seien (Grossmann *et al.*, 2008; Malinsky *et al.*, 2010). In Pflanzenzellen scheint den Membranmikrodomänen eine bedeutende Rolle in der "microdomain-associated endocytosis", einem alternativen, Clathrin-unabhängigen Endocytoseweg zuzukommen (Fan *et al.*, 2015).

## **2.2. MEMBRANTRANSPORT**

### **2.2.1. ENDOCYTOSE UND EXOCYTOSE IN HEFE**

Die Oberfläche von lebenden Zellen ist von einer Membran umgeben (Plasmamembran), welches das Zellinnere bzw. Cytoplasma von der externen Umgebung abgrenzt. Über diese Schnittstelle verläuft die Kommunikation der Zelle mit ihrer äußeren Umgebung ab. Die kontrollierte Aufnahme von Materie aus der Umgebung wird durch eine Vielzahl spezifischer Membranproteine mit verschiedenster Funktionen, welche die Plasmamembran durchspannen, gewährleistet. Die Zusammensetzung dieser Membranproteine in der Plasmamembran wird von Zellen je nach Umgebungsbedingung angepasst und optimiert. Die regulierte Aufnahme von Materie und

Plasmamembranbestandteilen erfolgt mittels der Endocytose (Besterman and Low, 1983; Doherty and McMahon, 2009). Während der Endocytose kommt es zur Invagination der Plasmamembran und zur Bildung eines endocytotischen Vesikels. Endocytotische Vesikel verschmelzen nach Internalisierung mit Kompartimenten der frühen Endosomen, welche zu späten Endosomen reifen. Späte Endosomen fusionieren mit den Lysosomen in tierischen- und der Vakuole in Pflanzen- und Hefezellen. Der Transport von intrazellulär synthetisierten Proteinen wie z.B. Ionenkanälen, Mating Pheromonen und Toxinen zur Plasmamembran oder in die Umgebung, erfolgt über den sekretorischen Weg (Abb.2). Sekretorische und Membranproteine werden am ER synthetisiert, modifiziert und über das trans-Golgi-Netzwerk, je nach Ihrem Bestimmungsort, in sekretorische Vesikel sortiert und zur Plasmamembran transportiert wo sie mit dieser verschmelzen.



**Abbildung 2: Grafische Repräsentation der verschiedenen intrazellulären Membran(protein)-Transportwege in der Bäckerhefe**

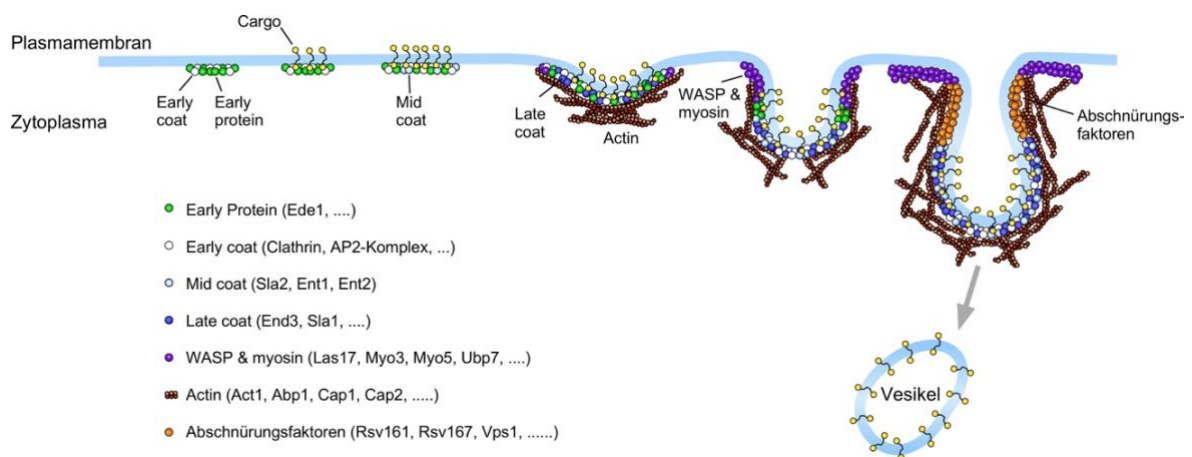
Lösliche und Membranproteine werden am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und zum Golgi-Apparat transportiert (grauer Pfeil). Im Golgi-Apparat werden Membranproteine modifiziert, in anterograde Transportvesikel für ER-ständige Proteine (grauer Pfeil) sortiert und über den sekretorischen Weg (SEC) zur Plasmamembran transportiert (blauer Pfeil) oder ins Außenmedium sekretiert. Vakuoläre Proteine werden durch das VPS (Vacuolar Protein Sorting) über die Endosomen zur Vakuole transportiert (roter Pfeil). Der endocytotische Weg wird zur Internalisierung von Plasmamembranproteinen und extrazellulären Materials verwendet (grüner Pfeil). Im frühen Endosomen (EE) werden internalisierte Proteine sortiert und zum Recycling an die Vakuole oder über den Golgi zurück zur Plasmamembran transportiert. Das frühe Endosomen reift zum späten Endosomen oder zum Multivesicular Body (MVB), von wo aus der Transport zur Vakuole erfolgt (Feyder *et al.*, 2015).

Nicht zu vernachlässigen ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass endocytotische und sekretorische Vesikel nicht nur Membranproteine (und intravesikuläre Ladung) zwischen ER, Golgi, Plasmamembran und Vakuole transportieren, sondern auch Lipide. Obwohl die meisten Lipide im ER synthetisiert werden, besitzen die verschiedenen Organellen einer

Zelle ihre ganz eigene Lipidzusammensetzung. Das bedeutet jedoch, dass Lipide, wie auch die Proteine, die am ER synthetisiert werden, transportiert werden müssen und dass eine Spezifität in den Transportwegen zu den verschiedenen Organellen existieren muss. Ähnlich den Proteinen muss eine Sortierung der Lipide in die verschiedenen Vesikel erfolgen (van Meer, 1989).

### 2.2.1.1. CLATHRIN-VERMITTELTE ENDOCYTOSE (CVE)

Clathrin-vermittelte Endocytose in der Bäckerhefe ist ein hochkomplexer Vorgang, an dem etwa 60 Proteine beteiligt sind, die an bestimmten Stellen der Plasmamembran geordnet rekrutiert, zu einem funktionalen Proteinkomplex zusammengebaut und auch wieder zerlegt werden. Dieser dynamische Prozess ist hochkonserviert mit ähnlichem Ablauf der einzelnen Schritte in Hefe und Säugerzellen. Etwa 85% der daran beteiligten Hefeproteine haben Homologe in Säugerzellen (Weinberg and Drubin, 2012). Die derzeitige Vorstellung des chronologischen Ablaufs eines endocytotischen Ereignisses in Hefe ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.



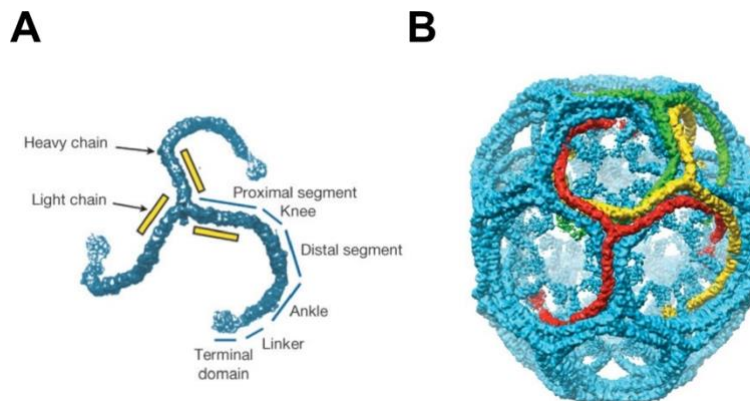
**Abbildung 3. Model der Clathrin-vermittelte Endocytose in der Bäckerhefe**

Einzelne Schritte der Clathrin-vermittelten Endocytose und daran beteiligte Proteine. Die zeitliche Abfolge beginnt links mit der Bestimmung der endocytotischen Stelle durch Anlagerung und Bindung von "frühen" Proteinen (u.a. Ede1) und endet rechts mit der Abschnürung eines Vesikels und dem Abstreifen des Clathrin-Mantels. Die Abbildung ist in Anlehnung an (Lu *et al.*, 2016).

Der Prozess beginnt mit der Bestimmung eines endocytotischen Ortes durch Bindung von "frühen" Proteinen wie Ede1p an die Membran, sowie der Ankunft früher Hüllproteine (Chc1p und Clc1p). Dem folgt relativ schnell die Anreicherung von Cargo-Molekülen. Die "mittleren" und "späten" Coat-Proteine haben überwiegend eine Rolle in der Bildung von Actin-Patches an der Membran. Die *SLA*- und *ENT*-Genprodukte fungieren als Adapterproteine, die Clathrin und Actin verbinden und so die Verknüpfung der membranständigen Actin-Patches zum Cytoskelett darstellen. Mehrere dieser frühen und mittleren Proteine sind ubiquitiniert oder besitzen Ubiquitin-Bindedomänen und stabilisieren

so die Interaktion zwischen vielen der etwa 60 Proteinen, die an der Clathrin-vermittelten Endocytose beteiligt sind oder regulieren die Protein-Protein-Interaktion innerhalb des endocytotischen Netzwerks. Die später ankommenden Proteine wie End3p oder Sla1p sind maßgeblich an der Organisation des Actin-Cytoskeletts beteiligt und initiieren die Einstülpung der Membran. Wichtig für die Ausbildung eines Actin-Netzwerks sind Proteine der WAS-Familie (Wiskott-Aldrich-Syndrom) wie Las17p und regulatorische Proteine wie Cap1p und Cap2p. Las17p und die Motorproteine Myo3p und Myo5p sind verantwortlich für die Membraninvagination. Während für die Abschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln in Säugerzellen Dynamin (eine GTPase) essentiell ist, ist eine Rolle von Dynamin in der Bäckerhefe umstritten. Vps1p ist ein Dynamin-ähnliches Protein, das an diesem Schritt der Endocytose in der Bäckerhefe beteiligt sein soll (Rooij *et al.*, 2010). Unbestritten ist jedoch die Beteiligung von Amphiphysin ähnlichen BAR-Domänen Proteinen (Rvs161p, Rvs167p) in Kombination mit dem Actin-Netzwerk an diesem letzten Schritt der Endocytose, der Abschnürung eines endocytotischen Vesikels (Goode *et al.*, 2015). Namensgebend für die Clathrin-vermittelte Endocytose ist eine wichtige Komponente des Proteinmantels der "Stachelsaumbälchen" oder Clathrin-Coated-Vesicles (CCV), die auch elektronenmikroskopisch darstellbar sind, ist das Clathrin (Kirchhausen, 2000; Fotin *et al.*, 2004). Der Clathrin-Mantel zeigt eine Gitterstruktur bestehend aus mehreren Clathrin-Triskelia. Ein Triskelion besteht aus drei leichten (Clathrin Light Chain, Clc1p) und drei schweren (Clathrin Heavy Chain, Chc1p) Clathrin-Ketten. Die Clathrin-schwere Kette lässt sich in die proximale, distale und N-terminale Domäne einteilen (siehe Abb. 4). An der proximalen Domäne existieren Bindestellen für die Clathrin-leichte Kette, wohingegen die N-terminale Domäne mit anderen Untereinheiten der Endocytosemaschinerie interagieren kann (Kirchhausen, 2000; Haar *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass die Clathrin-leichte Kette eine regulatorische Funktion bei der Zusammenlagerung des Triskelions hat (Ybe *et al.*, 1998; Brodsky *et al.*, 2001). Die Trimerisierung der schweren Kette wird durch die C-terminale Domäne in der Mitte des Triskelions vermittelt. Mehrere Triskelia setzen sich zu Fünf- oder Sechsecken zusammen und bilden das Gitternetz an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (Schmid, 1997; Greene *et al.*, 2000) (siehe Abb. 4). Obwohl die Clathrinhülle aus Clc1p und Chc1p besteht, sind diese beiden Proteine offensichtlich nicht gleich wichtig für die Endocytose in der Bäckerhefe (Silveira *et al.*, 1990). Hefemutanten mit Deletion der Clathrin-schweren Kette (Chc1p) sind lebensfähig, zeigen aber ein verlangsamtes Wachstum und ein gestörtes Matingverhalten (Jackson *et al.*, 1991). Endocytotische Prozesse sind in diesen Mutanten geringfügig beeinflusst und sind nur in einer verlangsamten Kinetik der Endocytose zu sehen (Munn, 2001). Clc1p scheint essentiell für die Trimerisierung von Chc1p und somit für die Bildung der Clathrin-Hülle zu

sein. Die genaue Funktion der Clathrin-leichten Kette im Prozess der Endo- und Exocytose ist bis heute jedoch nicht genau geklärt (Silveira *et al.*, 1990).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von Clathrin**

**A:** Clathrin ist ein Hüllprotein in Form eines Triskelions, das aus je drei Molekülen der schweren Kette (heavy chain) und der leichten Kette (light chain) gebildet wird. **B:** Clathrin Triskelia lagern sich zu einer Hülle um ein "reifes" Vesikel an (Fotin *et al.*, 2004).

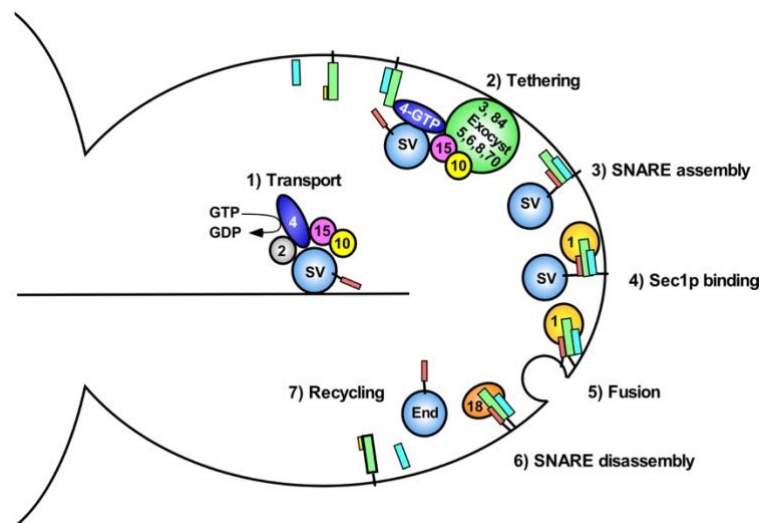
Allerdings wird diskutiert, dass Clc1p nicht nur für die Trimerisierung von Chc1p und somit für die Bildung der Clathrinhülle wichtig ist, sondern auch für den gegenläufigen Prozess, die Auflösung der Clathrinhülle, was den Prozess der Endocytose durchaus beeinflussen würde. Die Clathrin-vermittelte Endocytose ist essentiell für die Regulation von Ligandengesteuerten Rezeptorwegen wie z.B. die Internalisierung des  $\alpha$ -Faktor Rezeptors Ste2p, welche nach Endocytose eine Reihe von Signalkaskaden startet, um die Hefezelle auf das Mating vorzubereiten (Lu *et al.*, 2016).

#### 2.2.1.2. CLATHRIN-UNABHÄNGIGE ENDOCYTOSE

Die Bäckerhefe verfügt nur über einen Clathrin-vermittelten endocytotischen Weg (Clathrin-vermittelte Endocytose, CVE), und nicht zusätzlich über einen Clathrin-unabhängigen endocytotischen Weg, wie er in Säugerzellen oder Pflanzen bekannt ist (Mayor and Pagano, 2007; Fan *et al.*, 2015). So zumindest die gängige Meinung bis vor einigen Jahren (Weinberg and Drubin, 2012). Neben der CVE wurde in *S. cerevisiae* eine Clathrin unabhängige Endocytose (Rho-abhängige Endocytose) beschrieben, welche in einer speziellen Form in der  $\alpha$ -Arrestin regulierten Rezeptorinternalisierung involviert ist (Prosser *et al.*, 2011; Prosser *et al.*, 2015). Dieser Clathrin-unabhängige Weg der Endocytose ist abhängig von der GTPase Rho1p und dem Formin Bni1p, aber unabhängig von Clathrin und anderen frühen und mittleren Coat-Proteinen wie Ent1p und Ent2p.

### 2.2.1.3. EXOCYTOSE

Über exocytotische Prozesse werden neu synthetisierte Membranproteine vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert und in diese eingebaut (siehe Abb. 2). Der sogenannte sekretorische Weg konnte zum ersten Mal in pankreatischen exokrinen Zellen des Meerschweinchens beschrieben werden (Caro and Palade, 1964). In den frühen 1980er Jahren wurde die molekularen Mechanismen der Exocytose untersucht. Hierbei konnte durch die Untersuchung von SEC-Mutanten, welche nicht in der Lage waren ein extrazelluläres Enzym (Invertase) ins Außenmedium zu sezernieren, einige SEC-Gene identifiziert werden, welche wichtige Proteine der Exocytosemaschinerie codieren (Novick *et al.*, 1981; Bonifacino and Glick, 2004). Es wird vermutet, dass in Hefen zwei verschiedene exocytotische Wege vorhanden sind. Der erste führt vom Golgi-Apparat direkt zur Plasmamembran, während der zweite über intermediäre endosomale Kompartimente Vesikel zum Zielort transportiert (Harsay and Bretscher, 1995; Harsay and Schekman, 2002). Der Transport exocytotischer Vesikel zur Plasmamembran erfolgt über Tropomyosin-Aktin Filamente. Dieser Transport erfolgt in einem GTP-Sec4p und Myo2p abhängigen Prozess (Schritt1 in Abb.5).



**Abbildung 5: Modellvorstellung des sekretorischen Wegs in der Bäckerhefe**

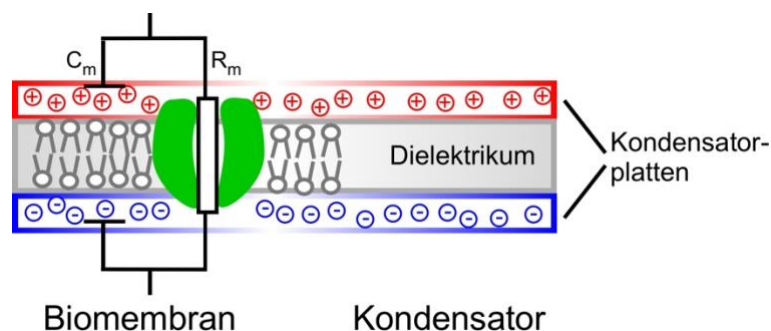
Dargestellt ist der sekretorische Weg in der Bäckerhefe beginnend mit dem Transport eines sekretorischen Vesikels mittels Motorproteinen (Schritt 1) über die Exocyst-vermittelte Anbindung an die Plasmamembran (Schritt 2) und Bildung eines SNARE-Komplexes (Schritt 3) bis zur Sec1p vermittelten Vesikelfusion (Schritte 4 und 5) und Auflösung und Recycling der SNARE-Komplexe (Schritte 6 und 7). Die beteiligten Sec-Proteine sind durch entsprechende Zahlen in den farbigen Elementen benannt ("4" = Sec4p, "18" = Sec18p). SV steht für sekretorischer Vesikel, END bezeichnet einen endocytotischen Vesikel. Die SNARE-Proteine sind als farbige Balken dargestellt. Abbildung in Anlehnung an (Grote *et al.*, 2000).



Ein Proteinkomplex, der Exocyst, bestehend aus Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p und Exo84p vermittelt die Anbindung der sekretorischen Vesikel an die Plasmamembran (Schritt 3 in Abb.5) und ermöglicht die Fusion des Vesikels mit der Membran (TerBush *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999). Dem geht die Bildung eines SNARE-Komplexes zwischen Plasmamembran-ständigen t-SNAREs (Sso1,2p), Sec9p und den v-SNAREs (Snc1,2p) der sekretorischen Vesikel voraus (Schritt 2 in Abb.5). Sec1p bindet an SNARE-Komplexe (nicht an freie SNAREs) (Schritt 4 in Abb.5) und stimuliert die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran (Schritt 5 in Abb.5). Dabei interagiert Sec1p mit Sec6p des Exocyst-Komplexes. Temperatursensitive SEC6-Mutanten (*sec6-4*) haben einen Defekt im letzten Schritt der Exocytose und reichern bei restriktiver Temperatur (37°C) sekretorische Vesikel im Cytoplasma an (Carrillo *et al.*, 2015). Nach erfolgter Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran wird der SNARE-Komplex unter Beteiligung von Sec18p aufgelöst (Schritt 6 in Abb.5). Es sind jedoch nicht nur die Proteine, die für die letzten Schritte der Exocytose, die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran, eine große Rolle spielen, sondern in erheblichem Maße auch Lipide. So zeigte sich, dass besonders Phosphatidylinositol-Phosphate (PIPs) für eine erfolgreiche Exocytose wichtig sind. Die beiden Untereinheiten des Exocyst-Komplexes, Sec3p und Exo70p, lokalisieren an spezifischen Regionen der Plasmamembran durch Interaktion mit PI4,5P und ermöglichen so das Andocken der Vesikel an die Plasmamembran (Smindak *et al.*, 2017).

### 2.3. ELEKTRISCHE EIGENSCHAFTEN BIOLOGISCHER MEMBRANEN

Biologische Membranen können elektrisch als RC-Glied betrachtet werden. Der Durchtritt elektrisch geladener Teilchen ist an die Aktivität Membran-ständiger Proteine (Carrier, Pumpen und Kanälen) gebunden.



**Abbildung 6: Minimales Ersatzschaltbild einer biologischen Membran**

Die Transportproteine, Ionenkanäle etc. bilden die Leitfähigkeit der Membran ( $G = 1/R_m$ ) und erlauben bei Aktivität elektrischen Stromfluss. Die Undurchlässigkeit der Lipidschicht für geladene Teilchen wirkt bei inaktiven Transportproteinen ( $G = 0$ ) als Dielektrikum und erlaubt Akkumulation von Ladung beiderseits der Membran ( $C_m$ ).

Sind diese ladungstransportierenden Membranproteine inaktiv, weil z.B. den Pumpen die Energie (ATP) fehlt oder die Membranspannung die Ionenkanäle im geschlossenen, nichtleitenden Zustand hält, dann wirkt die Membran ähnlich einem Dielektrikum in einem Kondensator. Sie trennt und speichert Ladungen auf beiden Seiten der Membran.

### **2.3.1. MESSUNG VON MEMBRANSPANNUNG UND MEMBRANLEITFÄHIGKEIT**

Du Bois-Reymond berichtete bereits 1848 von ersten Spannungsableitungen an Nervenfasern (Bois-Reymond, 1848). Er fand nach mechanischer Verwundung von Nerven eine große elektrische Spannungsdifferenz zwischen der verwundeten Stelle des Nervs (Innen) und der intakten Stelle (Außen). Elektrische Vorgänge an tierischen und pflanzlichen Zellen oder Organen wurden in späten 19. und frühen 20. Jahrhundert durch derartige indirekte Methoden vielfach beschrieben (Bernstein, 1912). Direkte Messungen von Membranspannung und Membranströmen an tierischen aber auch pflanzlichen Zellen wurden durch die Einführung von Glasmikroelektroden möglich (Osterhout, 1936; Hodgkin *et al.*, 1949; Hodgkin and Huxley, 1952). Die hier verwendeten KCl-gefüllten Glasmikroelektroden hatten Spitzendurchmesser im  $\mu\text{m}$ -Bereich und waren so klein genug, um in lebende Zellen eingeführt zu werden und tatsächliche Membranspannungen und Membranströme über Zellmembranen abzuleiten.

Die Patch-Clamp Technik revolutionierte die Elektrophysiologie. Durch diese von Neher und Sakmann 1976 beschriebene Messtechnik war es erstmals möglich, die Aktivität einzelner Membranproteine (Ionenkanäle) an lebenden Zellen zu erfassen (Neher and Sakmann, 1976). Durch Aufsetzen einer Glaspipette auf einen Membranabschnitt ("patch") der Plasmamembran, in welchem sich unterschiedlichste Proteine (Carrier, Ionenkanäle, Transporter) befinden, kann dieser Patch elektrisch isoliert (Giga-Ohm Abdichtwiderstand) und elektrophysiologisch untersucht werden. Diese zunächst an tierischen Zellen erfolgreich angewandte Technik fand in den 1980er Jahren auch Einzug in die Pflanzenphysiologie (Moran *et al.*, 1984; Schroeder *et al.*, 1984). Mit der Patch-Clamp Technik konnten erstmals auch verlässliche elektrophysiologische Untersuchungen an Zellen des Modellorganismus Hefe durchgeführt werden (Gustin *et al.*, 1986; Bertl and Slayman, 1990; Bertl and Slayman, 1992), die bis dahin aufgrund der sehr geringen Größe und damit verbundenem sehr hohen Membranwiderstand, sowie dem ungünstigen Verhältnis von Membranwiderstand zu Leckwiderstand für elektrophysiologische Messungen nicht zugänglich waren.

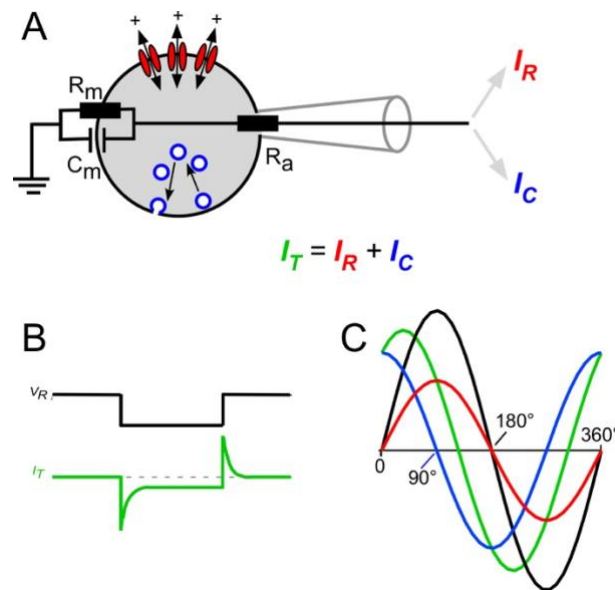
### 2.3.2. MESSUNG VON MEMBRANKAPAZITÄT

Eine spezielle Variante der Patch-Clamp Technik, die hochauflösende Messungen von elektrischen Kapazitätsänderungen an intakten Zellen erlaubt, wurde 1982 erstmals vorgestellt (Hamill *et al.*, 1981; Neher and Marty, 1982). Durch diese hochauflösenden Kapazitätsmessungen war es ähnlich wie bei den Einzelkanalmessungen mit der Patch-Clamp Technik zum ersten Mal möglich, elementare Ereignisse der endo- und exocytotischen Prozesse elektrisch aufzuzeichnen und biophysikalische Prozesse von Verschmelzung und Abschnürung von Vesikeln mit oder von der Plasmamembran zu untersuchen. Dieses ist möglich, da die Membrankapazität eine Funktion der Membranoberfläche ist und die Membranoberfläche durch endo- und exocytotische Ereignisse verändert wird. Während bei der Endocytose Abschnitte der Plasmamembran internalisiert werden, wodurch die Membranoberfläche und somit die Membrankapazität kleiner wird, führt bei der Exocytose die Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran zu einer Zunahme der Membranoberfläche und somit auch der Membrankapazität.

Wie kann jedoch die Membrankapazität gemessen werden? Betrachten wir zunächst eine Patch-Clamp Ableitung im Ganzzellmodus (Abb. 7A).

Der elektrische Strom an einer Zellmembran als Resultat einer angelegten Spannung ist die Summe aus den resistiven Strömen ( $I_R$ ), die überwiegend auf die Aktivität von Ionentransportproteinen zurückzuführen sind, und den kapazitiven Strömen ( $I_C$ ), die von der Aufladung der Membran mit der Doppellipidschicht als Dielektrikum herrühren. Bei einem rechteckigen Spannungspuls ist zunächst ein großer instantaner Strom messbar, der jedoch schnell abfällt und sich auf einem konstanten Niveau einpegelt (Abb. 7B). Der transiente Strom zu Beginn des Spannungspulses ist der kapazitive Strom, während der konstante Strom der resistive Strom ist.

Bei einer konstanten (langanhaltenden) Spannung ist demnach nur der resistive Strom messbar, der kapazitive Strom ist Null. Wird jedoch nicht eine konstante Spannung angelegt, sondern eine sich permanent ändernde, wie z.B. eine Sinusspannung, so ist im gemessenen Gesamtstrom über die gesamte Zeit eine endliche resistive und eine kapazitive Komponente enthalten (Abb. 7C). Wie jedoch in Abb. 3C zu erkennen, ist der resistive Anteil in Phase mit der angelegten Referenzspannung, während der kapazitive Anteil um  $90^\circ$  verschoben ist. Diese Phasenverschiebung kann nun genutzt werden, um aus dem gemessenen Gesamtstrom  $I_T$  die beiden Komponenten  $I_R$  und  $I_C$  zu extrahieren. (In der Elektrotechnik wird der Anteil des Gesamtstroms, der proportional zur Spannung ist, also in Phase ist, als Wirkstrom bezeichnet, der Anteil, der um  $90^\circ$  phasenverschoben ist als Blindstrom.)



**Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Patch-Clamp-Ableitung an einer Zelle**

**A:** Schema einer Ganzzellableitung und elektrisches Ersatzschaltbild mit Membranwiderstand ( $R_m$ ) für die Ionentransportsysteme (rot) und Membrankapazität ( $C_m$ ) für den Bilayer.  $R_a$  stellt den seriellen Zugriffs Widerstand dar. Der Gesamtstrom  $I_T$  ist die Summe aus den resistiven Strömen ( $I_R$ ) und den kapazitiven Strömen ( $I_C$ ). **B:** Gesamtstrom ( $I_T$ ) in Antwort auf einen rechteckigen Spannungspuls ( $V_R$ ). Unmittelbar nach Spannungsänderung (zu Beginn und zum Ende des Spannungspulses) treten sehr große Ströme auf, die aber sehr schnell auf ein konstantes Niveau abfallen. Der instantane Strom repräsentiert den kapazitiven Strom, während der verbleibende konstante Strom der resistive Strom ist. **C:** Bei Anlegen einer sinusförmigen Referenzspannung (schwarz) kann ein sinusförmiger Gesamtstrom (grün) gemessen werden. Dieser ist allerdings deutlich in der Phase verschoben und eilt der Spannung etwas voraus. Der Gesamtstrom ist die Summe aus dem resistiven Strom (rot), der in Phase mit der Referenzspannung ist und dem kapazitiven Strom (blau), der der Spannung um  $90^\circ$  vorausseilt.

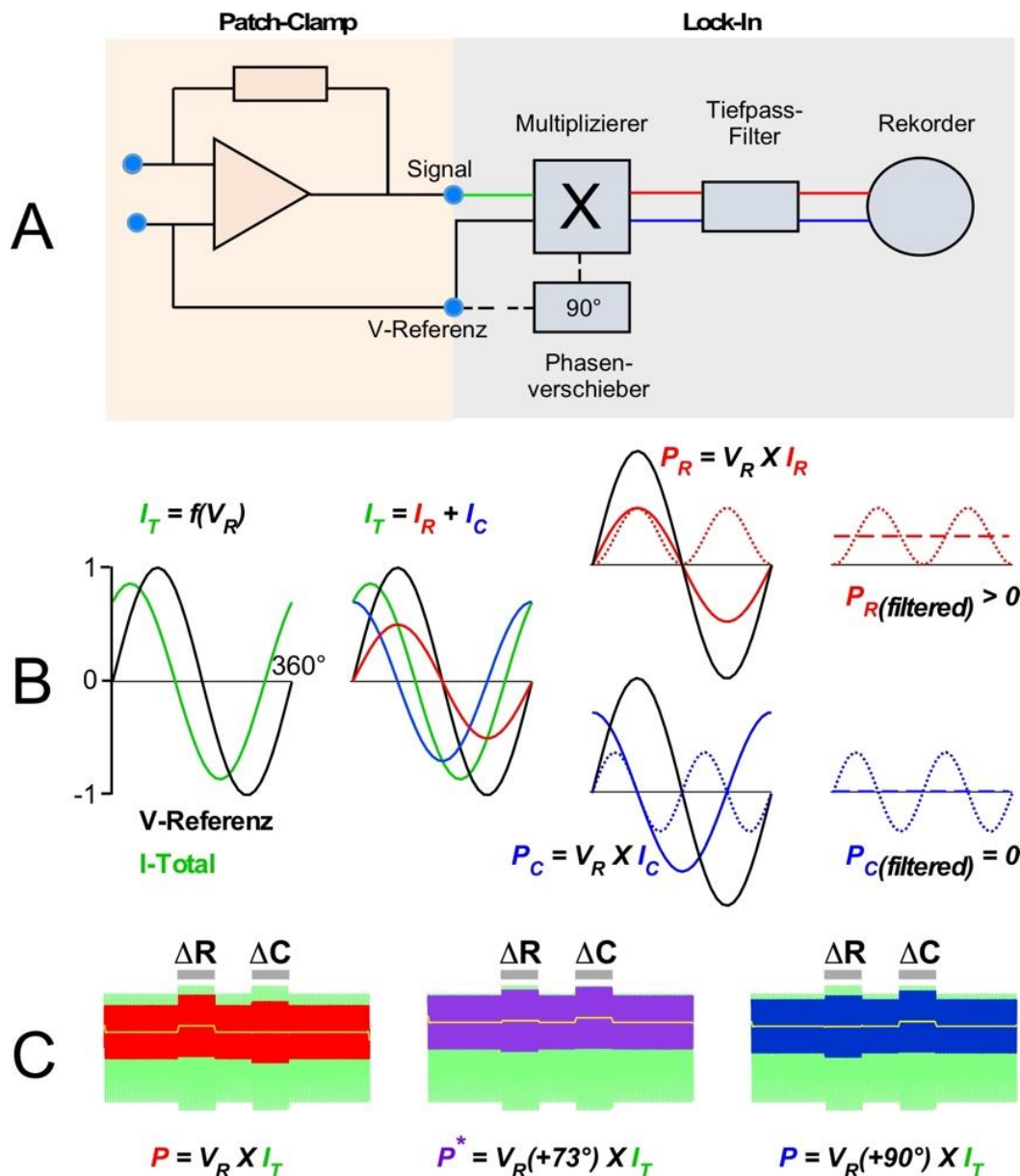
Die Messanordnung für Kapazitätsmessungen besteht grundsätzlich aus einem Patch-Clamp-Modul und einem nachgeschalteten Lock-In-Modul (Abb. 8A). Das Patch-Clamp-Modul dient zum Anlegen einer sinusförmigen Referenz-Spannung ( $V_R$ ) und der Ableitung des dadurch induzierten Gesamtstroms ( $I_T$ ) an einer Zelle oder an einem Membranpatch (Abb. 8B).

Dieser gemessene Gesamtstrom ist gegenüber der Referenzspannung leicht phasenverschoben und setzt sich zusammen aus dem resistiven Strom ( $I_R$ ), der mit  $V_R$  in Phase ist und dem kapazitiven Strom ( $I_C$ ), der gegenüber  $V_R$  um  $90^\circ$  verschoben ist. Die Phasenverschiebung des Gesamtstroms hängt von den relativen Anteilen der kapazitiven und resistiven Komponente ab. Bei dominierender resistiver Komponente ( $I_R \gg I_C$ ) ist die Phasenverschiebung nahe  $0$ , während bei dominierender kapazitiver Komponente ( $I_R \ll I_C$ ) die Phasenverschiebung des Gesamtstroms nahe  $90^\circ$  liegt. Multipliziert man den Gesamtstrom mit der Referenzspannung, so wird aus der resistiven Komponente, die ja mit  $V_R$  in Phase ist, ein sinusförmiges Signal mit halber Amplitude und doppelter Frequenz (gepunktete rote Kurve in Abb. 8B). Dieses Produkt aus Spannung und Wirkstrom wird in

der Elektrotechnik als Wirkleistung (hier  $P_R$ ) bezeichnet. Die Wirkleistung nimmt hier nie negative Werte an ( $P_R \geq 0$ ). Wird dieses Signal mit einem Tiefpass gefiltert, so wird aus dem sinusförmigen Signal ein konstantes Signal mit endlicher Amplitude (gestrichelte rote Linie in Abb. 8B). Die kapazitive Komponente des Signals, die ja gegen  $V_R$  um  $90^\circ$  verschoben ist, würden nach Multiplikation mit  $V_R$  ebenfalls ein sinusförmiges Signal mit halber Amplitude und doppelter Frequenz ergeben (gepunktete blaue Kurve in Abb. 8B), liegt jedoch zur Hälfte im positiven und zur Hälfte im negativen Bereich der Amplitude.

Wird nun dieses Signal (Blindleistung  $P_C$ ) mit einem Tiefpass gefiltert, so ergibt sich wiederum ein konstantes Signal, das nun aber bei Null liegt (gestrichelte blaue Linie in Abb. 8B). Dies wäre nun die Situation im roten Kanal in Abb. 8A, der also das resistive Signal ausgeben würde und den kapazitiven Anteil ( $P_C = 0$ ) eliminieren würde. Wird aber das Gesamtsignal  $I_T$  nicht mit  $V_R$  sondern mit  $(V_R + 90^\circ)$  multipliziert, so wäre dann die kapazitive Komponente mit  $(V_R + 90^\circ)$  in Phase und wir würden das kapazitive Signal messen und den resistiven Strom (der ja jetzt  $90^\circ$  phasenverschoben ist) eliminieren. Dies wäre die Situation im blauen Kanal in Abb. 8A.

Dieses Prinzip wird in Abb. 8C simuliert. Gezeigt ist hier das selbe Gesamtsignal ( $I_T$ ) wie in Abb. 8B, jedoch über eine Zeitspanne von 120 Perioden. Die Referenzspannung ( $V_R$ ) entspricht ebenfalls der schwarzen Kurve in **B**, ist der Übersichtlichkeit halber in **C** nicht explizit gezeigt. Die grauen Balken bezeichnen jeweils zwei Ereignisse, eine Kanalöffnung ( $\Delta R$ ) und ein exocytotisches Ereignis ( $\Delta C$ ). Die rote Kurve (ganz links) repräsentiert das Produkt aus Gesamtsignal (grün) und Referenzspannung. Hier sind deutlich Abweichungen sowohl beim ersten als auch beim zweiten grauen Balken zu sehen. Filtert man dieses rote Signal aber mit einem Tiefpass, so erhält man die gelbe Spur, in der sich nur die Kanalöffnung ( $\Delta R$ ) als Änderung im Signal offenbart, während vom exocytotischen Ereignis nichts zu sehen ist. Die blaue Kurve (ganz rechts) repräsentiert das Produkt aus Gesamtsignal (grün) und der um  $90^\circ$  verschobenen Referenzspannung ( $V_R + 90^\circ$ ). Diese Phasenverschiebung wird durch den Phasenverschieber (siehe Abb. 8A) erreicht. Wie in der roten Kurve, so ist auch in der blauen Kurve (ganz rechts) sowohl beim ersten, als auch beim zweiten grauen Balken ein Signal zu erkennen. Nach Tiefpassfilterung (gelbe Spur) bleibt hier jedoch nur das Signal für das exocytotische (=kapazitive) Ereignis übrig, die Kanalöffnung wird in dieser Spur nicht sichtbar. Somit können wir mit Hilfe des Lock-In Moduls aus dem gemessenen Signal den resistiven Strom (Abb. 8C ganz links) und den kapazitiven Strom (Abb. 8C ganz rechts) extrahieren. Dies erfordert jedoch immer korrekte Phaseneinstellung.



**Abbildung 8: Prinzip der Kapazitätsmessung an biologischen Membranen**

**A:** Der Versuch besteht grundsätzlich aus einem Patch-Clamp Modul und einem nachgeschalteten Lock-In Modul. **B:** Der gemessene Gesamtstrom ( $I_T$ ) ist eine Funktion der sinusförmigen Referenzspannung  $V_R$ , ist aber leicht phasenverschoben. Durch Multiplikation des Signals mit der Referenzspannung und anschließender Tiefpassfilterung können resistive und kapazitive Komponente extrahiert werden. **C:** Simulation einer Messung mit Darstellung des resistiven Stroms (ganz links) und des kapazitiven Stroms (ganz rechts). Die eigentlich zu betrachtende Meßspur ist jeweils die gelbe Linie. In dieser Simulation wird ein Kanalereignis ( $\Delta R$ ) und ein exocytotisches Ereignis ( $\Delta C$ ) simuliert. Das mittlere Panel zeigt eine Kapazitätsmessung mit nicht korrekter Phaseneinstellung. Hier sind in der kapazitiven Spur (gelbe Linie) zwei "exocytotische" Ereignisse zu sehen, obwohl nur eines bei  $\Delta C$  vorhanden ist. Die Simulation in B und C wurde mit IGOR pro durchgeführt. Die grünen Bereiche in C sind für alle drei Teile gleich und geben einen größeren Zeitabschnitt (120 Perioden) des Gesamtstroms (siehe grüne Kurve in B) wieder.

Bei inkorrekt eingestellter Phase, wie in Abb. 8C Mitte simuliert, würden falsch positive Signale auftreten. In dieser Simulation ist der kapazitive Strom bei unvollständiger Phasenverschiebung ( $V_R$  wurde um  $73^\circ$  statt  $90^\circ$  verschoben) gezeigt. Es wird deutlich, dass in der gelben Spur auch am ersten grauen Balken ein Signal auftritt (scheinbar kleines

exocytotisches Ereignis), obwohl hier ein Ionenkanal öffnet und keine Vesikelverschmelzung auftreten soll.

Weshalb kann nicht einfach das  $V_R$ -Signal und das  $(V_R + 90^\circ)$  Signal für die Multiplikation verwendet werden? In der Praxis treten bei Patch-Clamp Experimenten Kapazitäten auf, die von der Apparatur herrühren und eine leichte Phasenverschiebung unseres "Nullsignals" bewirken können. Dies muss durch den Phasenverschieber zuerst kompensiert werden, bevor dann  $V_R$  konstant um  $90^\circ$  verschoben werden kann.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Hefestämme

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4742	MATalpha <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
Δ <i>clc1</i>	BY4741 <i>clc1::kanMX4</i>	Euroscarf
Δ <i>chc1</i>	BY4741 <i>chc1::kanMX4</i>	Euroscarf
BCY1	BY4742 <i>ole1::P<sub>MET3</sub>-OLE1</i>	(Degreif, 2014)
BCY2	BY4742 <i>erg9::tetO<sub>2</sub>-P<sub>CYC1</sub>-ERG9</i>	(Degreif, 2018)
X3	MATa <i>his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Novotná <i>et al.</i> , 2004)

#### 3.2. PLASMIDE

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Plasmid	<i>E. coli</i> Marker	Hefe Marker	Referenz
pGREG576	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>kanMX, URA3, HIS3</i>	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)
pGREG600	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>kanMX, URA3, HIS3</i>	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)

#### 3.3. PUFFER UND MEDIEN

**Tabelle 3: Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae***

YPD		SD-X	
10 g/L	Hefeextrakt	6,9 g/L	YNB w/o amino acids
20 g/L	Pepton	x g/L	-X Dropout-Supplement
20 g/L	Glukose	20 g/L	Glukose

x=DO-ura: 0,77 g/L; DO-met-leu: 0,63 g/L; DO-met-ura: 0,66 g/L. Der pH Wert aller SD-Medien wurde mit L-Arginin auf pH 5.8 eingestellt. Für die Herstellung von Agarmedien wurde zusätzlich 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben. YPD (pH4,7 wurde mit Citronensäure eingestellt). Weicharger enthielt 0,5% Agar anstelle von 2%.

**Tabelle 4: Medien zur Anzucht von *E. coli***

LB + X	
5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	Trypton
10 g/L	NaCl

X = Ampicillin: 100 mg/L nach dem Autoklavieren auf 60°C abkühlen lassen und zupipettieren. Der pH-Wert aller Medien wurde mit NaOH auf pH 7.2 eingestellt. Für die Herstellung von Agarmedien wurde zusätzlich 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben.



**Tabelle 5: Puffer für die Protoplastierung von Hefe und Elektrophysiologie**

<b>Inkubationspuffer (Puffer A)</b>		<b>Protoplastenpuffer (Puffer B)</b>	<b>Stabilisierungspuffer (Puffer C)</b>	
50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Puffer A + 2,4 M Sorbitol	200–250 mM	KCl,
0.2%	(β-ME)		10 mM	CaCl <sub>2</sub>
pH7,2	mit KOH		5 mM	MgCl <sub>2</sub>
			5 mM	MES
			1%	Glukose
			pH 7.2	mit Tris-Base

<b>Sealingpuffer (Puffer D)</b>		<b>Pipettenlösung (Puffer E)</b>	
150 mM	KCl	50 mM	KCl,
10 mM	CaCl <sub>2</sub>	250 mM	Sorbitol
5 mM	MgCl <sub>2</sub>	0,1 mM	CaCl <sub>2</sub>
5 mM	MES		
1%	Glukose		
pH 7.2	mit Tris-Base		

### 3.4. TESTS AUF K1 KILLERTOXIN-SENSITIVITÄT

#### 3.4.1. ISOLIERUNG VON K1 KILLERTOXIN AUS DEM HEFESTAMM X3

X3 Killerhefen wurden in 15 mL YPD (pH 4,7) bei 22°C und 80 rpm für 16 Stunden angezogen. Die Hefen wurden bei 4°C für 20 Minuten und 4000 rpm pelletiert und der Überstand mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) sterilfiltriert. Die weitere Aufreinigung des Überstands erfolgte mit Amicon 10 kDa Zentrifugal Filter Einheiten (Millipore Merck KGa). Die Probe wurde wie vom Hersteller empfohlen bei 4°C und 4000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Überstand, der das aufkonzentrierte K1 Protein enthielt wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

#### 3.4.2. ÜBERPRÜFUNG DER KILLER-SENSITIVITÄT DER HEFESTÄMME DURCH HEMMHOFTESTS

Die Killereigenschaft der erzeugten Hefestämme wurde mit dem Hemmhofstest überprüft. Dazu wurden die auf Sensitivität gegenüber dem Killertoxin K1 zu untersuchenden Hefestämme über Nacht in 10 mL YPD angezogen und die Zellsuspensionen auf eine OD<sub>600</sub> = 1 eingestellt. 50 µL dieser Zellsuspension wurden in 6 mL und 42°C warmen Weichagar (YPD pH 4,7) gegeben, gut gemischt und zur Übersichtung auf eine 2%ige Agar-Platte gleicher Zusammensetzung gegeben. Die Platte wurde für 1 Stunde bei

Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen des Weichagars wurden 20 µL der zu testenden Substanz oder der X3-Flüssigkultur auf den Weichagar getropft. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 21° C inkubiert.

### **3.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

#### **3.5.1. PLASMIDISOLIERUNG AUS *E. COLI***

*E. coli* (DH5α) mit Plasmid wurden auf eine LB + Amp Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde gepickt, in 3 mL LB+Amp Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm auf dem Schüttler angezogen. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Plasmid Miniprep-Kit Classic (Zymo Research, USA), wobei gemäß Herstellerangaben verfahren wurde.

#### **3.5.2. PLASMIDISOLIERUNG AUS HEFE**

Aus einer frischen Übernachtskultur wurden 10 mL einer Hefesuspension für 3 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL eines Inkubationspuffers mit 0,9 M Sorbitol/0,1 M EDTA resuspendiert, erneut für 1 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, in 400 µL 0,9 M Sorbitol/0,1 M EDTA resuspendiert und mit 3 µL Zymolyase-20T (100 mg/mL) versetzt. Der Zymolyase-Verdau erfolgte bei 30°C für 45 min. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Zymo Plasmid Miniprep-Kit classic (Zymo Research, USA) wie auch bei der Plasmidisolierung aus *E. coli*.

#### **3.5.3. LINEARISIERUNG VON PLASMIDEN**

Plasmide der pGREG-Serie (pGREG576, pGREG600) wurden durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym Sall (FastDigest von Fermentas Life Science) linearisiert. Dadurch wird der *HIS3*-Selektionsmarker, der von zwei Sall-Schnittstellen flankiert wird, aus dem Plasmid geschnitten. Der Restriktionsverdau erfolgte nach Herstellerangaben. Die erfolgreiche Linearisierung des Plasmids wurde nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung in einem 1% Agarosegel überprüft.

#### **3.5.4. POLYMERASE-KETTENREAKTION**

Die Amplifizierung von DNA-Sequenzen, die in Plasmide kloniert werden sollten, erfolgte mit Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2x Mastermix, New England Biolabs, USA) unter unten aufgeführtem PCR Ansatz und Protokoll. Die erfolgreiche Amplifikation wurde in einem 1% Agarosegel überprüft.

**Tabelle 6: Primer, die in dieser Arbeit benutzt wurden.**

Primer	Sequenz (5' --> 3')	Klonierung
P1-fw	<u>GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACA</u> ATGACAAGGTTTCATGAACAGC	GFP-TOK1
P2-rv	<u>GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGA</u> CTCAAAGTGTCTTTCTATGCTC	GFP-TOK1
P3-fw	<u>GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACA</u> ATGTTTGGATTAAATAAAGC	NUP49-GFP
P4-rv	<u>GTTCTTCTCCTTTACTCATTCTCGAGGTCGA</u> TATGCTCAATGATGCCAGTG	NUP49-GFP

Homologieregionen der Überhangprimer, die zur Rekombination-basierten Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen.

**Tabelle 7: PCR-Ansatz für 25 µL zur Amplifikation zu klonierender Inserts**

Menge	Produkt	Bezugsquelle
100 ng	genomische DNA	AMS
1 µL	Primer fw (10 pmol)	Eurofins
1 µL	Primer rv (10 pmol)	Eurofins
12,5 µL	Q5 2x Mastermix	NEB
X µL	H <sub>2</sub> O	

**Tabelle 8: PCR-Protokoll zur Amplifikation zu klonierender Inserts**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen	Prozess
1	5 min	98°C	25X	init. Denaturierung
2	30 sek	98°C		Denaturierung
3	30 sek	55°C		Annealing
4	30 sek/1 kb	72°C		Elongation
5	7 min	72°C		finale Elongation
6	∞	4°C		Kühlung

### 3.5.5. TRANSFORMATION VON *E. COLI*

Eine *E. coli*-Kolonie (DH5α) wurde in 3 mL LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Frisches LB-Medium (50 mL) wurde mit 300 µL der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 angezogen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten auf Eis abgekühlt, in zwei sterile 25 mL Zentrifugenröhrchen verteilt und für 10 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in 2 mL vorgekühlter, steriler 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lsg. resuspendiert. Weitere 18 mL eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurden zugegeben und die *E. coli* wurden für 1 h auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 10 min bei 5000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen

und das Pellet in 0,5 mL eiskalter Kryolösung (50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin) resuspendiert. Die Zellen konnten direkt transformiert oder bei -80°C bis zu 3 Monate gelagert werden. Kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. In einem sterilen Eppendorfgefäß wurde 0,1 µg Plasmid DNA vorgelegt, kompetente *E. coli* (100 µL) zupipettiert, gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese für 5 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. 1 mL frisches LB Medium wurde hinzugegeben und für 1-2 Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 5.000 rpm schonend abzentrifugiert. 0.9 mL des Überstands wurde verworfen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Die *E. coli* Suspension wurden auf eine LB+Amp Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.5.6. TRANSFORMATION VON HEFE**

Aus einer Übernachtskultur des zu transformierenden Hefestammes wurde eine 1:20 Verdünnung angesetzt und für ca. 4-6 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert bis eine Zelldichte von etwa 10<sup>7</sup> Zellen/mL (OD<sub>600</sub> = 0,8-1,2) erreicht war. Die Hefezellen wurden mit Hilfe des Frozen EZ Yeast Transformation II-Kit (Zymo Research, USA) kompetent gemacht und transformiert. Dafür wurden die Zellen zunächst für 4 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µL EZ 1 Lösung resuspendiert. Die Hefezellen wurden erneut pelletiert und in 100 µL EZ 2 Lösung resuspendiert. Die nun kompetenten Hefen konnten direkt transformiert oder bis zur Verwendung für bis zu 2 Monate bei -80°C gelagert werden. Für die Transformation wurden 100 µL der kompetenten Hefezellen in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt, 1 µg Plasmid-DNA und 500 µL EZ 3 zugegeben, für 45 min bei 30°C inkubiert und alle 15 min gevortext wurden. Abschließend wurden 150 µL der Zellen auf entsprechende Selektivmedien ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Klonierung von *TOK1* bzw. *NUP49* durch Homologe Rekombination in Hefe wurde bei der Transformation gleichzeitig 5 µL linearisiertes Plasmid und 5 µL PCR-Produkt zu den kompetenten Hefezellen zugegeben.

### **3.5.7. HERSTELLUNG VON PROTOPLASTEN AUS HEFE**

10 mL einer frischen Übernachtskultur des zu protoplastierenden Hefestammes wurden in ein 15 mL Falcon überführt und für 5 min bei 2000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 3 mL Inkubationspuffer A resuspendiert und für 15 min bei 30°C inkubiert. Nach Inkubation wurden 4 mL Protoplastierungspuffer B, 150 mg Bovine Serum Albumin (BSA), 10 µL Zymolyase (100 mg/ µL) zugegeben und die Zellen für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand

verworfen und das Pellet in 10 mL Stabilisierungspuffer C vorsichtig resuspendiert. Je nach Experiment wurde den Zellen 1% Glukose, 2% Galaktose. Die Protoplasten konnten bis zu 7-9 Tage bei Raumtemperatur inkubiert und verwendet werden [6].

### **3.6. PROTOPLASTENWACHSTUM**

Für die Untersuchung des Protoplastenwachstums wurden 20  $\mu$ L einer Protoplastensuspension in einem inversen Mikroskop (Zeiss, Axiovert 135) mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon, EOS 450D) fotografiert. Die Bilder wurden in Photoshop importiert und ausgewertet. Die Daten für die Protoplastengrößen sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 50 Protoplasten.

### **3.7. KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)**

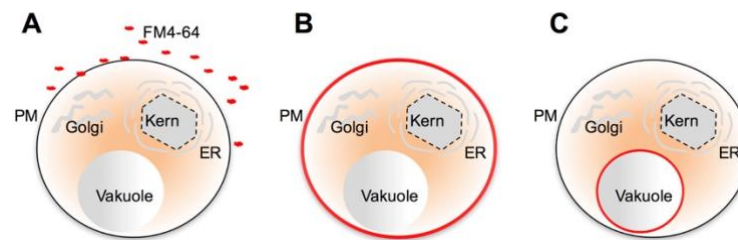
Für Aufnahmen am konfokalen Laser-Rastermikroskop (Leica TCS SP5 II, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) wurden 40  $\mu$ L der zu untersuchenden Zellsuspension auf Cover-Slips pipettiert und unter Einsatz eines 100-x Öl-Immersionsobjektivs (HCX PL APO CS 100x/ 1.44) mikroskopiert. Die Anregung der verwendeten Fluorophore (FM4-64, GFP) erfolgte mittels eines Argon Lasers. GFP emittiert Licht in einem Wellenlängenbereich von 505-580 nm (grüne Fluoreszenz) wenn diese mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird. FM4-64 emittiert Licht im Wellenlängenbereich von 600-850 nm (rote Fluoreszenz) nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software LAS AF Lite (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg).

### **3.8. MEMBRANMARKIERUNG MIT DEM LIPOPHILEN FARBSTOFF FM4-64**

Für die Untersuchung der funktionalen Endocytose in Hefen wurde der lipophile Styrylfarbstoff FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-diethylamino) phenylhexatrienyl) pyridinium dibromide)) verwendet (Vida and Emr, 1995). Der Farbstoff ist nicht membranpermeabel und interkaliert im äußeren Leaflet des Bilayers der Plasmamembran, wenn extern zugegeben. FM4-64 zeigt nur in einer hydrophoben Umgebung, also in den Markierungsexperimenten mit Hefeprotoplasten nur in Membranen deutliche Fluoreszenz. Die Aufnahme von FM4-64 in die Zelle (oder Protoplast) erfolgt in Abhängigkeit von Zeit, Temperatur und Energie und somit höchstwahrscheinlich durch Endocytose. In Abhängigkeit der Zeit werden zunächst Plasmamembran, dann kleine intrazelluläre Kompartimente (Endosomen) und ultimativ die Membran der Vakuole durch FM4-64 markiert. Zur Verfolgung des endocytotischen Wegs und der qualitativen Überprüfung

endocytotischer Aktivität in Hefeprotoplasten wurde eine frische Übernachtskultur der zu untersuchenden Hefestämme protoplastiert und für 24 Stunden in Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose inkubiert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der FM4-64 Internalisierung in Hefe**

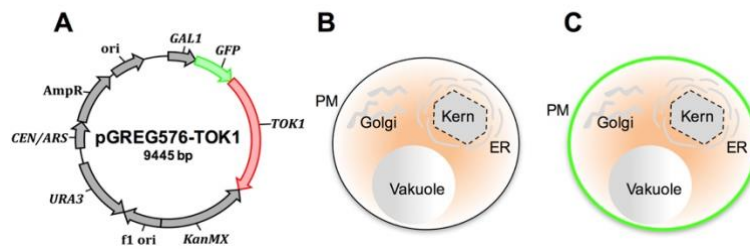
**A:** Protoplasten werden für 30 Minuten mit 20  $\mu\text{M}$  FM4-64 bei 30°C in Stabilisierungspuffer C inkubiert. Dabei interkaliert der Farbstoff in der Plasmamembran der Hefeprotoplasten. **B:** Nach Inkubation werden die Proben abzentrifugiert, gewaschen und mit frischem Stabilisierungspuffer C resuspendiert. Hierbei wird der restliche Farbstoff vom Außenmedium entfernt. Protoplasten zeigen eine rote fluoreszierende Plasmamembran. **C:** Mittels endocytotischer Vesikel wird FM4-64 in die Zelle aufgenommen und findet sich schließlich in der Vakuolenmembran wieder. Funktionale Endocytose spiegelt sich in einem rot fluoreszierenden Tonoplast wieder.

Die Protoplasten wurden vor den CLSM Aufnahmen 30 min mit 20  $\mu\text{M}$  des Endocytose-Markers FM4-64 (Invitrogen, Life Technologies Corp., Darmstadt, Germany) bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten für 5 min bei 2000 rpm pelletiert, in frischem Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose resuspendiert und erneut bei 30°C für 10-120 min inkubiert. Die Internalisierung des Endocytose-Markers FM4-64 wurde anschließend mit CLSM Aufnahmen dokumentiert. Für diese Experimente ist es wichtig, dass nach der Inkubation der Protoplasten in FM4-64 haltigem Puffer diese durch Zentrifugation und Resuspension in FM4-64 freiem Puffer sorgfältig gewaschen werden, um restlichen Farbstoff aus dem Außenmedium zu entfernen, da ansonsten verbleibende Reste zu einer Nachfärbung der Plasmamembran führen würden.

### 3.9. FLUORESCENZMARKIERUNG DER PLASMAMEMBRAN

Zur Demonstration der funktionalen Exocytose wurde der Kaliumkanal Tok1p Plasmid-basiert als N-terminales GFP-Fusionsprotein in Hefe exprimiert. Im pGREG576 Plasmid erfolgt die Expression von *TOK1* unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors (*GAL1*).

Eine frische Übernachtskultur der Hefestämme welche das Plasmid pGREG576-*TOK1* tragen wurde protoplastiert und in Stabilisierungspuffer C + 2% Galaktose bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Protoplasten vorsichtig in frischem Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose resuspendiert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Fluoreszenz der Plasmamembran wurde mit CLSM Aufnahmen dokumentiert.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Untersuchung funktionaler Exocytose mittels Tok1-GFP**

**A:** Schematische Darstellung des pGREG576-TOK1 Plasmids mit GAL1-Promotor und N-terminalem TOK1-GFP Fusionskonstrukt. **B:** Protoplasten mit pGREG576-TOK1 Plasmid exprimieren in Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose kein Tok1-GFP und zeigen keine fluoreszierende Plasmamembran. **C:** Protoplasten mit pGREG576-TOK1 Plasmid zeigen nach 24 h Inkubation in Stabilisierungspuffer C + 2% Galaktose eine grün fluoreszierende Plasmamembran. Über den sekretorischen Weg wird der Ionenkanal Tok1p-GFP mittels sekretorischer Vesikel zur Plasmamembran transportiert, die im Falle erfolgreicher Vesikelfusion und somit funktionaler Exocytose eine grüne Fluoreszenz aufweist.

### 3.10. ELEKTROPHYSIOLOGIE UND DATENANALYSE

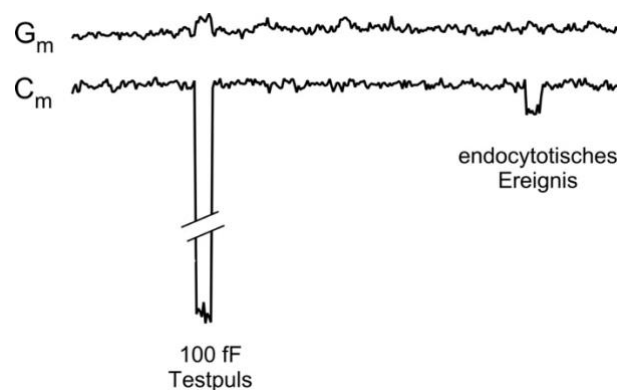
#### 3.10.1. MESSUNG VON KAPAZITÄTSÄNDERUNG MIT DER PATCH-CLAMP-TECHNIK

Kapazitätsmessungen wurden mit einem Lock-In Verstärker (SWAM-2C, Celica d.o.o., Ljubljana, Slowenien) durchgeführt und mit der CellAn (Celica d.o.o, Ljubljana, Slovenia) Software aufgezeichnet.

Glaskapillaren (Kimble Products, USA) wurden mit einem Pipettenziehgerät (PB-7 Narishige, Japan) zu Messpipetten mit Spitzendurchmessern von 1-2  $\mu\text{m}$  ausgezogen. Die Spitzen wurden unter mikroskopischer Kontrolle hitzepoliert. Um Kapazitätsänderungen in Hefeprotoplasten messen zu können, wurde zunächst eine frische Übernachtskultur der zu untersuchenden Hefen protoplastiert und 10  $\mu\text{L}$  der frischen Protoplasten in die mit 200  $\mu\text{L}$  Sealingpuffer D + 1% Glukose gefüllte Messkammer pipettiert. Nach etwa 10-15 min waren die Protoplasten abgesunken und hafteten am Glasboden der Messküvette. Um die Kapazität der Glaspipette zu minimieren wurde der Schaft der Messpipette mit Paraffin beschichtet. Nach Abtrocknen des Paraffins wurde die Messpipette mit Pipettenlösungspuffer E gefüllt. Kleinere Luftbläschen in der Messpipette wurden durch Klopfen mit dem Fingernagel vorsichtig entfernt. Um eine Verschmutzung der Messpipette beim Eintauchen in die Messkammer zu vermeiden wurde auf die Messpipette ein Überdruck angelegt. Nach Eintauchen der Messpipette in die Messkammer wurde das Elektrodenpotenzial in der Software WinWCP (J. Dempster, Univ. of Strathclyde, UK) abgeglichen und der Spannungsoffset auf null gesetzt. Die Messpipette wurde mittels eines

Mikromanipulators an einen mittelgroßen Protoplasten herangeführt. In einer Entfernung von etwa 1-2 Protoplastendurchmessern wurde der Überdruck von der Pipette genommen, sodass bei finaler Annäherung der Messpipette auf wenige  $\mu\text{m}$  der Protoplast nicht weggespült wurde. Durch leichtes Saugen wurde ein Unterdruck in der Messpipette erzeugt und der Protoplast an die Pipettenöffnung gesaugt. Der Protoplast wurde nun mit der Messpipette von der Glasoberfläche abgehoben. Dies verhindert Beschädigungen des Protoplasten durch mechanische Verschiebungen (Drift oder Erschütterungen) zwischen Glasboden der Messküvette und der Messelektrode. Zur Etablierung einer hochohmigen Abdichtung zwischen Zellmembran und Glasmikropipette wurde der Strom in Antwort auf einen Testpuls von 5 mV am Oszilloskop (und Computermonitor) als Maß für Pipetten- bzw. Abdichtwiderstand kontinuierlich verfolgt. Der Widerstand mit Puffer D in der Messküvette und Puffer E in der Patch-Pipette betrug bei offener Pipette in der Badlösung etwa 10-15 M $\Omega$  und erhöhte sich nach Ansaugen eines Protoplasten zunächst nur unwesentlich. Der Unterdruck wurde leicht erhöht und konstant gehalten. Dies resultierte zunächst in einem raschen Anstieg des Widerstands gefolgt von einem langsamen weiteren Anstieg des Widerstands.

Wenn sich der Widerstand nicht mehr merklich änderte, wurde der Unterdruck weiter erhöht und wieder konstant gehalten. Dies wurde solange schrittweise durchgeführt, bis der Abdichtwiderstand zwischen Protoplastenmembran und Glasmikropipette im G $\Omega$ -Bereich war.



**Abbildung 11: Beispiel einer Patch-Clamp Ableitung mit Testpuls und endocytotischem Ereignis**

In dieser Ableitung sind die beiden Spuren, die resistive Spur ( $G_m$ ) und die kapazitive Spur ( $C_m$ ) gezeigt. Zu Beginn der Messung wurde ein Testpuls von 100 fF appliziert, der zu einer starken Änderung in der  $C_m$ -Spur führte. Die Amplitude dieser Auslenkung kann nun benutzt werden, um die Größe der Kapazitätsänderung (und daraus die Vesikelgröße) des endocytotischen Ereignisses (rechts) zu bestimmen. In diesem Beispiel (Simulation, keine reale Messung) ist zu sehen, dass ein endocytotisches Ereignis *per se* keine Änderung in der  $G_m$ -Spur hervorruft. Am Testpuls ist in der  $G_m$ -Spur jedoch eine kleine Ablenkung nach oben zu sehen. Dies ist die Folge einer nicht absolut korrekten Phaseneinstellung (siehe 1.3.2 Abb.8), die in dieser Simulation bewusst eingebaut wurde.



Dadurch war die Cell-attached Konfiguration erreicht, die in der Patch-Clamp Technik die Ableitung von Einzelkanalströmen oder in der Variante der Kapazitätsmessung die Erfassung von Kapazitätsänderungen im fF-Bereich als Folge von elementaren endo- und exocytotischen Ereignissen erlaubt. Um die spannungsabhängigen Ionenkanäle im Plasmalemma von Hefeprotoplasten zu inaktivieren, wurde eine Haltespannung von -40 mV angelegt. Nach Anlegen einer sinusförmigen Spannung von 111 mV RMS (**R**oot **M**ean **S**quare) und 1.6 kHz konnte die Software CellAn gestartet werden. In dieser wurden die Daten bei 100 Hz Tiefpass gefiltert und bei 200 Hz gesampelt.

Die Sinus-Kompensation und die korrekte Einstellung des Phasenwinkels von 90° wurden mit einem 100 fF Testpuls überprüft (Abb.11). Der Testpuls diente der späteren Auswertung als Referenzkapazität. Je Messung wurden bis zu 1200 sek aufgezeichnet und gespeichert.

### **3.10.2. ANALYSE DER DATEN AUS KAPAZITÄTSMESSUNGEN**

Die Auswertung der Kapazitätsmessungen erfolgte wie in (Carrillo *et al.*, 2015) beschrieben. Die Darstellung der Originalspuren und der ausgewerteten Kapazitätsmessungen wurde mit der Software Igor Pro (Igor Pro 6.3.6, Wavemetrics, USA) durchgeführt.

#### 4. ERGEBNISSE

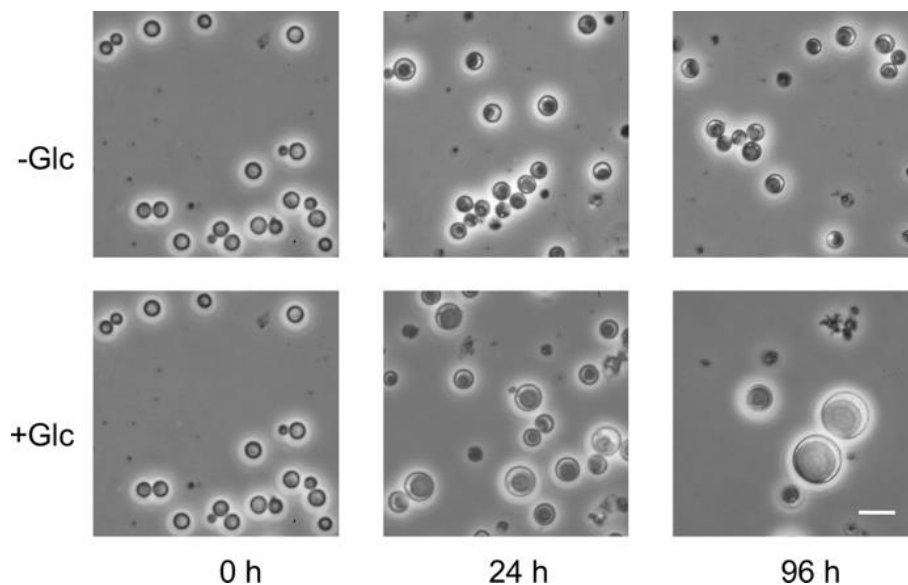
Die Patch-Clamp Technik und somit auch die Messung von Änderungen der Membrankapazität mit dieser Technik erfordert den freien Zugang der Messelektrode zur Plasmamembran. Dies ist kein Problem in den meisten tierischen Zellen, sehr wohl aber in Zellen von Pflanzen oder Pilzen, die über eine stabile Zellwand aus Polysacchariden verfügen, die den Protoplasten umgibt. Die Anwendung der Patch-Clamp Technik an Pflanzen- oder Pilzzellen erfordert eine schonende Entfernung der Zellwand, was in der Regel enzymatisch, bei großen Zellen auch mechanisch erfolgen kann (Bertl and Gradmann, 1987). Sowohl mechanisch, als auch enzymatisch hergestellte Pflanzenprotoplasten zeigen lichtabhängige Änderungen der Membranspannung und Aktionspotentiale und scheinen daher physiologisch intakt zu sein (Bertl and Gradmann, 1987; Spalding *et al.*, 1992).

##### 4.1. HEFEPROTOPLASTEN WACHSEN

Um zu testen, ob enzymatisch hergestellte Hefeprotoplasten physiologisch aktiv sind, wurden isolierte Protoplasten des haploiden Referenzstammes BY4741 für mehrere Tage bei 25°C in Stabilisierungspuffer mit und ohne Glukose als Kohlenstoffquelle inkubiert. In Medium mit Glukose konnten Protoplasten mehr als 9 Tage inkubiert werden und zeigten kontinuierliches Zellwachstum, ohne sich jedoch durch Knospung/Teilung zu vermehren. Obwohl die Protoplastierung "nur" sauber, aber nicht unter strikt sterilen Bedingungen erfolgte, war in den Protoplastenpräparationen auch nach 7-9 Tagen keine Bakterienkontamination zu sehen, wenn dem Inkubationsmedium Glukose (oder Galaktose) als Kohlenstoffquelle zugegeben wurde. Ohne verwertbare Kohlenstoffquelle war dagegen bereits nach 24 h ein deutliches Bakterienwachstum und Verschwinden (Lyse) der Hefeprotoplasten zu beobachten. Um bakterielle Kontaminationen zu verhindern wurde den Protoplastenpräparationen ohne Glukose zusätzlich 100 µg/mL Ampicillin zugegeben. Ampicillin hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Protoplasten in Anwesenheit von Glukose oder Galaktose.

Frische Protoplasten von haploiden Hefezellen haben einen Durchmesser von etwa 4-5 µm, der in Medium ohne Glukose über einen Zeitraum von bis zu 96 h unverändert blieb (Abb. 12, obere Reihe). In Anwesenheit von Glukose waren die Protoplasten dagegen bereits nach 24 h deutlich größer als zum Zeitpunkt 0 h. Nach 96 h waren die meisten Protoplasten zwischen 10-12 µm im Durchmesser (Abb. 12 untere Reihe). Dieses Zellwachstum entspricht einer Oberflächenzunahme von bis zu 400 µm<sup>2</sup> (1000%), was durch Membranausdehnung alleine nicht erklärbar ist. Die Dehnung biologischer Membranen kann maximal für Oberflächenvergrößerungen von 2-3% verantwortlich sein,

wie detaillierte Studien zu mechanischen Eigenschaften der Plasmamembran von Pflanzenprotoplasten gezeigt haben (Wolfe and Steponkus, 1983). Einer Vergrößerung der Membranoberfläche der Hefeprotoplasten, wie sie hier beobachtet wurde, scheint daher zwingend der Einbau von Lipiden, etwa durch Fusion sekretorischer Vesikel und damit durch Exocytose zugrunde zu liegen.



**Abbildung 12: Wachstum von Hefeprotoplasten**

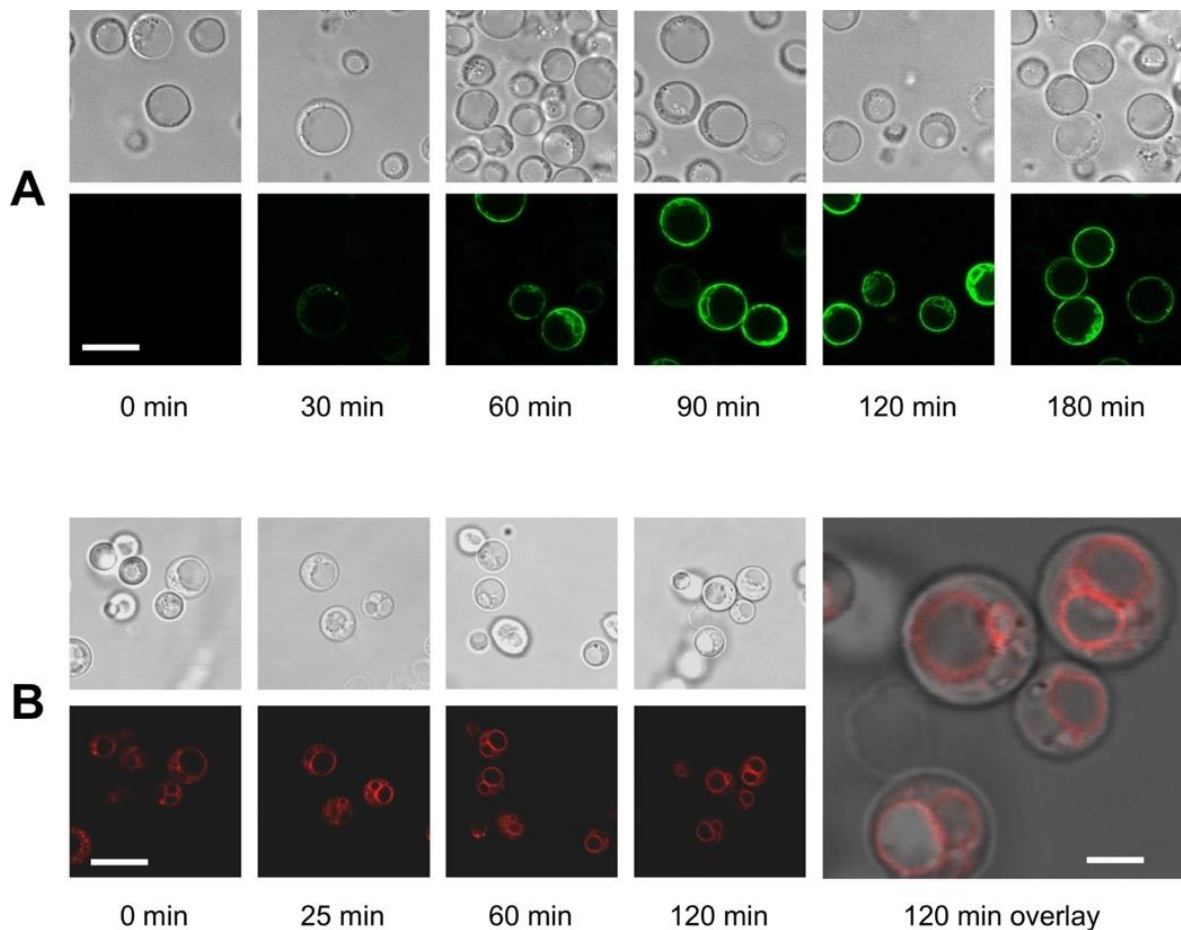
Vergleich von Protoplasten des haploiden Hefestammes BY4741, inkubiert bei 25°C in Stabilisierungspuffer (siehe Material und Methoden) ohne (oben) und mit 1% Glukose (unten). Aufnahmen von frischen Protoplasten (0 h), nach 24 h und nach 96 h Inkubation. Größenmarker ist 10 µm.

#### 4.2. ENDOCYTOSE/EXOCYTOSE IST IN PROTOPLASTEN INTAKT

Um zu zeigen, dass Hefeprotoplasten nicht nur wachsen, was wahrscheinlich auf eine Oberflächenvergrößerung durch Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran zurückzuführen ist, sondern tatsächlich auch Endocytose und Exocytose durchführen, wurden diese Prozesse fluoreszenzoptisch verfolgt.

Um zu überprüfen, ob die isolierten Hefeprotoplasten exocytotische Aktivität aufweisen, wurde der Einbau eines GFP markierten Proteins (Tok1p) in die Plasmamembran untersucht. Hefezellen (BY4741-pGREG576-TOK1) wurden über Nacht in SD-ura angezogen. Dieser Hefestamm besitzt das Plasmid pGREG576-TOK1, in dem der induzierbare *GAL1*-Promotor dem GFP-TOK1 Fusionskonstrukt vorgeschaltet ist. Protoplasten wurden aus der Übernachtskultur isoliert und für 24 h in Stabilisierungspuffer mit 1% Glukose inkubiert. Die Protoplasten wurden pelletiert, in Stabilisierungspuffer mit 2% Galaktose resuspendiert und bei 25°C inkubiert. Bereits nach 30 min Inkubation in Galaktose war eine leichte periphere Fluoreszenz an den Protoplasten zu erkennen, die

nach 60 min schon sehr deutlich und nach 90-180 min voll ausgebildet war (Abb. 13A). Das Membranprotein Tok1p wird am ER synthetisiert und über den sekretorischen Weg vesikulär zur Plasmamembran transportiert und durch Verschmelzung der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran in diese eingebaut. Somit konnte gezeigt werden, dass Hefeprotoplasten sowohl aktive Transkription und Translation, als auch einen intakten intrazellulären Vesikeltransport und Exocytose aufweisen.



**Abbildung 13: Exocytose und Endocytose in Hefeprotoplasten**

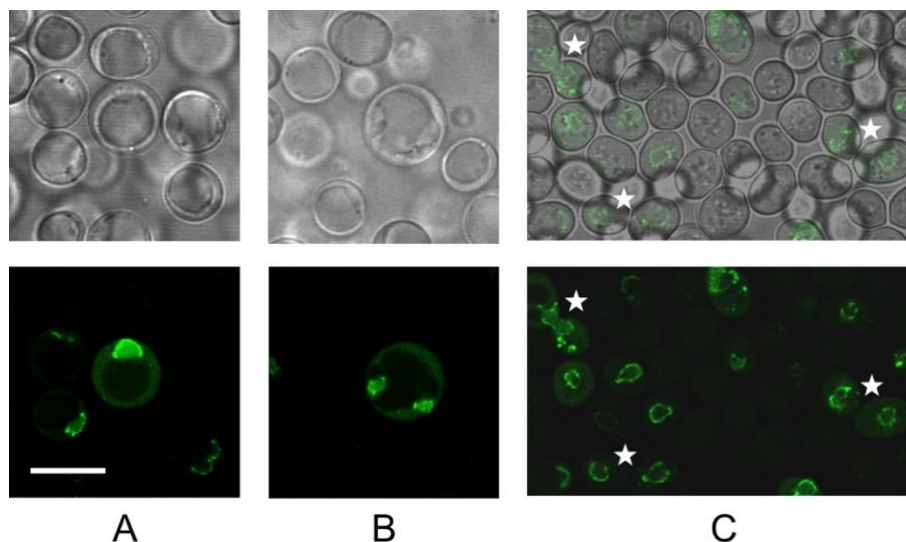
**A:** Funktionierende Exocytose in Hefeprotoplasten wurde getestet durch Plasmid-basierte Expression von Tok1p-Gfp in 24 h alte Wildtypprotoplasten (BY4741). **B:** Internalisierung des Endocytosemarkers FM4-64 in frischen, 2 h alten Hefeprotoplasten. Die Überlagerung (ganz rechts) ist eine vergrößerte Ausschnittsdarstellung der 120 min Bilder. Größenmarker ist 10  $\mu\text{m}$  bzw. 2  $\mu\text{m}$  für die Überlagerung ganz rechts.

Zum Nachweis der Endocytoseaktivität wurden frische Hefeprotoplasten (2 h nach Isolierung und Inkubation in Stabilisierungspuffer mit Glukose) mit dem Endocytosemarker FM4-64 (200  $\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit Stabilisierungspuffer gewaschen und mikroskopiert. FM4-64 lagert sich in das äußere Leaflet der Plasmamembran ein und wird durch Endocytose internalisiert. Die endocytotischen Vesikel

mit dem FM4-64 in ihrer Membran verschmelzen letztendlich mit der vakuolären Membran, sodass diese dann eine deutliche Fluoreszenz aufweist (Abb. 13B).

In Abb. 13B ist zu erkennen, dass bereits nach Auswaschen des fluoreszierenden Farbstoffs FM4-64 (0 min) ein Teil der Fluoreszenz intrazellulär lokalisiert war. Nach 25 min war bereits eine deutliche Markierung der Vakuolenmembran zu sehen. Nach 90 bzw. 120 min war die Fluoreszenz fast exklusiv in der Vakuolenmembran lokalisiert, was insbesondere in der vergrößerten Überlagerung deutlich zu sehen ist.

Die Ergebnisse aus den Wachstumsexperimenten (Abb. 12) und den Studien zur Exocytose und Endocytose (Abb. 13) deuten darauf hin, dass in den Protoplastenpräparationen alle Voraussetzungen gegeben sind, um Endo-/Exocytose in Hefen mit elektrophysiologischen Methoden zu untersuchen (Carrillo *et al.*, 2015; Cucu *et al.*, 2017): die Plasmamembran ist für Glasmikroelektroden frei zugänglich, die Protoplasten leben und zeigen endocytotische und exocytotische Aktivität.



**Abbildung 14: Markierung der Zellkerne durch Nup49p-GFP Fusionskonstrukte**

Plasmid-basierte Expression des GFP-markierten Kernporen-Proteins Nup49p in 48 h alten Protoplasten des Wildtypstammes BY4741. **A:** Protoplasten mit einem (markierten) Zellkern, **B:** Deutliche Fluoreszenz in zwei getrennten Bereichen, anliegend an die zentrale Vakuole, **C:** Fluoreszenzaufnahmen von intakten Zellen mit GFP-markiertem Nup49p (unten) und zugehörige Überlagerung von Durchlicht und Fluoreszenz (oben). Die weißen Sterne markieren Zellen, die sich im Endstadium der noch nicht vollständig erfolgten Teilung mit Mutterzelle und großer Tochterzelle befinden und zwei fluoreszierende Kernbereiche zeigen. Größenmarker ist 10 µm.

Aus den Wachstumsexperimenten (Abb. 12) konnte man erkennen, dass Protoplasten zwar wachsen, d.h. an Volumen zunehmen, sich aber nicht durch Knospung und Abschnürung vermehren wie intakte Zellen. So stellte sich die Frage, ob Protoplasten nur einen Defekt in der Knospung/Zellteilung haben, oder ob hier ein Zellzyklus-Arrest vorliegt. Um dies zu

überprüfen wurden die Zellkerne durch GFP-Markierung eines Kernporen-Proteins (Nup49p) sichtbar gemacht.

Hefezellen (BY4741) mit pGREG600-*NUP49* wurden zur Expression von Nup49p-GFP über Nacht in SGal-ura angezogen, protoplastiert, 48h in Stabilisierungspuffer mit 2% Galaktose inkubiert und mikroskopisch untersucht. Die Zellkerne konnten in den Protoplasten deutlich als periphere, lokal begrenzte Fluoreszenz identifiziert werden (Abb. 14). Die meist ringförmige Fluoreszenz bestätigt die Lokalisation des Kernporenproteins Nup49p in der Kernhülle. Da pro Protoplast jeweils 1 oder 2 Kerne, nicht jedoch mehr sichtbar waren, liegt die Vermutung nahe, dass die Protoplasten zwar Stoffwechsel-aktiv sind und sowohl energieabhängiges Zellwachstum (Abb.12), Endocytose, Exocytose, sowie Transkription und Translation aufweisen (Abb.13), allerdings vermutlich im Zellzyklus arretiert sind. Das Auftreten von zwei Kernen pro Protoplast rührt vermutlich daher, dass einige Zellen zum Zeitpunkt der Protoplastierung bereits eine recht große Tochterzelle und bereits zwei Zellkerne besaßen, die Abschnürung der Tochterzelle aber noch nicht komplett vollzogen war (siehe Markierungen in Abb. 14C).

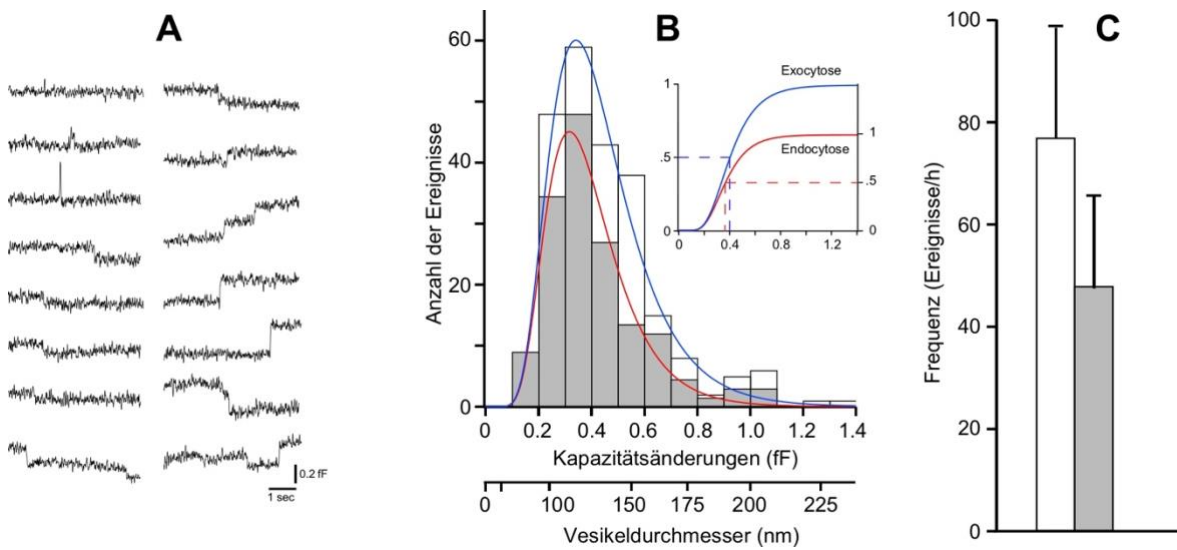
#### **4.3. ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN ELEMENTARER EREIGNISSE DER ENDOCYTOSE/EXOCYTOSE**

In den Cell-attached Ableitungen von haploiden Hefeprotoplasten zeigten sich charakteristische Fluktuationen der Membrankapazität im femto-Farad und subfemto-Farad Bereich (Abb. 15). Die Membrankapazität änderte sich sprunghaft, wobei die Änderungen positiv (Zunahme der Kapazität) oder negativ (Abnahme der Kapazität) waren. Die Zunahme der Kapazität spiegelt eine Zunahme der Membranoberfläche durch Verschmelzung eines sekretorischen Vesikels wieder, während endocytotische Aktivität, also Membraninvagination und Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran, durch eine Abnahme der Kapazität (Verringerung der Membranoberfläche) angezeigt wird. Sowohl transiente als auch permanente endocytotische und exocytotische Ereignisse konnten beobachtet werden (Abb. 15A).

Die Ergebnisse der Kapazitätsmessungen von Protoplasten des haploiden Hefestammes BY4741 (WT) in welchen Daten aus vier unabhängigen Messungen mit einer Gesamtmessdauer von 196 Minuten ausgewertet wurden, zeigen, dass 60% der Ereignisse exocytotische Vesikelfusionen mit der Plasmamembran waren. Dementsprechend waren die restlichen 40% der Kapazitätsänderungen endocytotische Ereignisse (Abb. 15A). Die Größenverteilung der Vesikel konnte durch eine Log-Normalverteilung (rote und blaue Linie) der Form

$$N(C) = N_{max} \exp \left[ - \left( \frac{\ln(C/C_0)}{w} \right)^2 \right]$$

beschrieben werden (Abb. 15B). Dabei ist  $N_{max}$  die Amplitude im Maximum (Höhe des Peaks),  $C_0$  die Kapazität mit den meisten Ereignissen (horizontale Position des Peaks; Modalwert) und  $w$  die Breite der Log-Normalverteilung, definiert als  $\ln(C/C_0)$  bei  $N(C) = 1/e$ . Exocytotische Ereignisse traten mit einer mittleren Frequenz von  $f_{ex} = 77 \text{ h}^{-1}$ , endocytotische Ereignisse mit einer Frequenz von  $f_{end} = 48 \text{ h}^{-1}$  auf, was in einem Verhältnis von  $f_{ex}/f_{end} = 1,6$  resultiert.



**Abbildung 15: Kapazitätsänderungen gemessen in Wildtyp-Hefeprotoplasten**

**A:** Beispiele für transiente und permanente Kapazitätsänderungen gemessen an frischen WT-Protoplasten. Jede Spur ist 5 sek lang. Positive Änderung der Kapazität (Aus Schlag nach oben) entsprechen einer Vergrößerung der Oberfläche und zeigen daher ein exocytotisches Ereignis an. Entsprechend korrespondieren Ablenkung nach unten mit Verkleinerung der Oberfläche resultierend aus endocytotischen Ereignissen. **B:** Vesikelverteilung der Kapazitätsänderungen von 156 endocytotischen und 250 exocytotischen Ereignissen aus Kapazitätsmessungen von 7 Protoplasten bei einer Gesamtmessdauer von 196 min. Die Verteilung der endocytotischen (rote Kurve) und exocytotischen (blaue Kurve) Kapazitätsänderungen wurden mit einer Log-Normalverteilung beschrieben. Das Inset zeigt die Bestimmung der Mediane als Halbmaximum der kumulativen Wahrscheinlichkeit aus der Verteilungsfunktion, die durch Integration der Log-Normal-Kurven erhalten wurde. **C:** Mittlere Frequenz der exocytotischen (weißer Balken) und endocytotischen (grauer Balken) Ereignisse aus **B**.

Da exocytotische Vesikel mit 0,4 fF (126 nm) im Median nur geringfügig größer waren als die endocytotischen Vesikel, die 0,36 fF oder einen Durchmesser von etwa 120 nm aufwiesen (Abb. 15B, Inset), ist das Protoplastenwachstum, wie es in den Experimenten zu Abb. 12 beobachtet wurde, durch das Ungleichgewicht zugunsten der exocytotischen Aktivität gegenüber der endocytotischen Aktivität ( $f_{ex}/f_{end} = 1,6$ ) gut zu erklären.

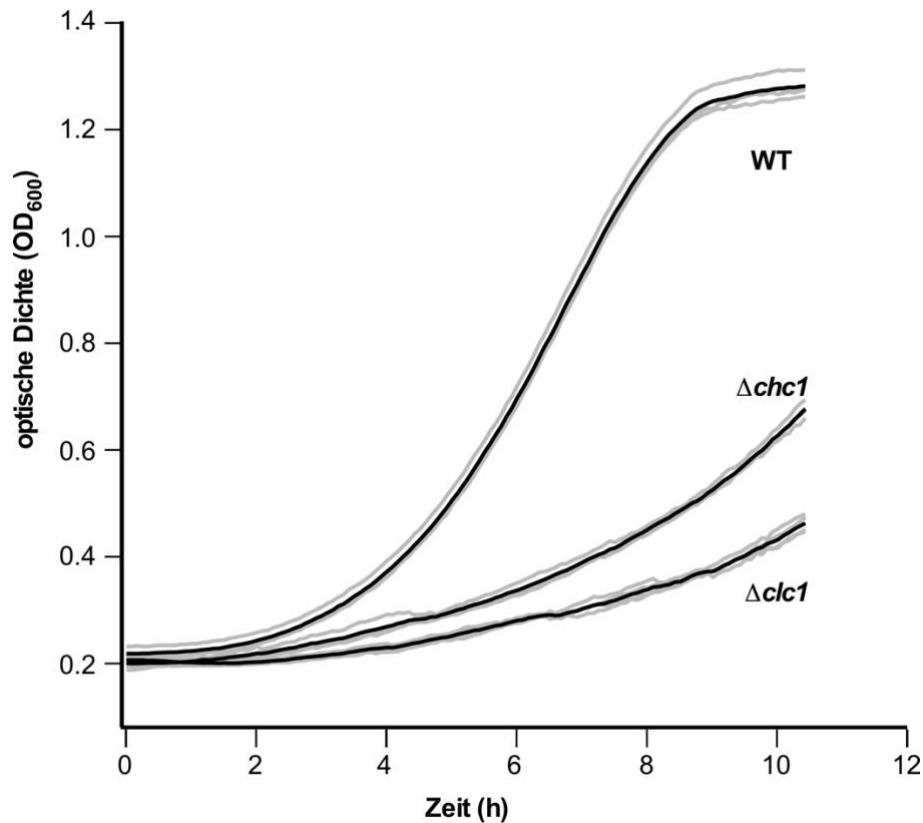
#### 4.4. BEDEUTUNG VON CLATHRIN FÜR DIE ENDO-/EXOCYTOSE IN HEFEN

Das Verhältnis von exocytotischer/endocytotischer Aktivität scheint für die Physiologie von Hefen von großer Wichtigkeit zu sein. So konnte in *S. pombe* gezeigt werden, dass die Balance zwischen Endocytose- und Exocytoseaktivität die Wirksamkeit bestimmter Antibiotika maßgeblich bestimmt (Nishimura *et al.*, 2014). Wir konnten mit einer temperatur-sensitiven Mutante zeigen, dass eine der Komponenten des Exocyst, Sec6p, essentiell für die Verschmelzung sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran ist (Carrillo *et al.*, 2015; Carrillo, 2015). Temperaturabhängige Inaktivierung von Sec6p resultierte in einer Akkumulation von sekretorischen Vesikeln im Cytoplasma und wegen des Wegfalls exocytotischer Aktivität zu einem Stopp des Zellwachstums. Wird der temperaturabhängige Block aufgehoben, so kommt zu einem sehr starken Wachstum der Protoplasten, was aufgrund des in elektrophysiologischen Experimenten gemessenen temporären Anstiegs der exocytotischen Ereignisse aus einem deutlichen Ungleichgewicht zwischen Exocytose-/Endocytoseaktivität (zugunsten der Exocytoseaktivität) resultiert.

Die Clathrin-vermittelte Endocytose ist die wichtigste und bis vor kurzem auch die einzig bekannte Form der Endocytose in der Bäckerhefe. Eine alternative, Clathrin-unabhängige Form der Endocytose in der Bäckerhefe wurde erst vor wenigen Jahren von der Arbeitsgruppe von B. Wendland beschrieben (Prosser *et al.*, 2011) und ist heute auch weitestgehend akzeptiert. Um den Beitrag der Clathrin-vermittelten Endocytose zur Gesamtendocytose und dadurch zur Physiologie der Hefen zu untersuchen, war es naheliegend, die Gene, die für die Strukturelemente des Clathrinmantels codieren, zu deletieren und die Auswirkungen auf die Endocytose zu studieren.

Das Wachstum von Wildtyp BY4741 und der beiden isogenen Deletionsmutanten *chc1* und *clc1* wurde in 24-Wellplatten in einem Mikroplatten-Spektralphotometer bei 30°C unter konstantem Schütteln als Änderung der Absorption bei 600 nm erfasst, wobei alle 5 min eine Messung erfolgte. Während Wildtypzellen über einen Zeitraum von 10 h ein normales Wachstumsverhalten zeigten, das sich durch eine Lag-Phase mit nachfolgender exponentieller Phase und Übergang in eine stationäre Phase nach 10 h auszeichnete, war das Wachstum der beiden Deletionsmutanten deutlich verlangsamt (Abb. 16). Dabei war zu sehen, dass die Deletion von *CLC1* eine stärkere Hemmung des Wachstums bewirkte, als die Deletion von *CHC1* (Abb. 16). Diese Beobachtung ist konsistent mit Berichten in der Literatur (Payne and Schekman, 1985; Silveira *et al.*, 1990), in denen eine (unterschiedlich starke) Wachstumshemmung durch Deletion von *CLC1* oder *CHC1* ebenfalls gezeigt wurde.





**Abbildung 16: Wachstum von Wildtyp und Clathrin-Deletionsmutanten in Flüssigkultur**

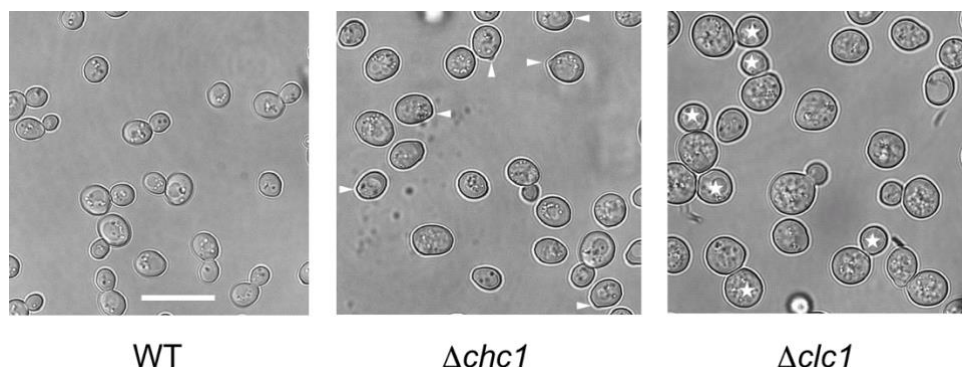
Wachstum von intakten Wildtyp-Zellen (BY4741) und Clathrin-Deletionsmutanten ( $\Delta chc1$ ,  $\Delta clc1$ ) in YPD-Medium bei 30°C und kontinuierlichem Schütteln. Zellen wurden in 24-Wellplatten in einem Mikroplatten Spektralphotometer (Epoch2; Biotek) kultiviert. Die Mikroliterplatten wurden kontinuierlich geschüttelt und bei 30°C temperiert. Die OD<sub>600</sub> wurde alle 5 min gemessen. Die schwarzen Kurven sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Messungen, die grauen Kurven entsprechen den einzelnen Messungen.

Diese Hemmung des Zellwachstums der Clathrin-Deletionsmutanten ist jedoch nicht einfach zu erklären und auf den ersten Blick auch überraschend. Wie in der Einleitung (Kap. 1.2.1.) dargelegt, ist die Clathrin-vermittelte Endocytose die wichtigste Form der Endocytose in der Bäckerhefe. Da die beiden Clathrinproteine (Clc1p und Chc1p) miteinander interagieren und so den Clathrinmantel bilden, wäre zu erwarten, dass durch Deletion eines dieser beiden Gene die Clathrin-vermittelte Endocytose wegfällt, was in einem starken Ungleichgewicht zwischen Exo-/Endocytose zugunsten der exocytotischen Aktivität resultieren sollte. Dies wiederum sollte tendenziell eher in einer Steigerung und nicht zu einer Hemmung des Wachstums resultieren.

Als Maß für das Wachstum von Wildtyp und Clathrin-Deletionsmutanten (Abb. 16) wurde die Änderung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) einer Flüssigkultur betrachtet. Hierbei sind jedoch zwei Parameter von Bedeutung. Bei konstanter Zellgröße ist die Änderung der OD<sub>600</sub> in einem begrenzten Bereich (OD<sub>600</sub> = 0,1-1) proportional zur Zellzahl. Allerdings ist die

OD<sub>600</sub> auch abhängig von der Zellgröße, d.h. bei konstanter Zellzahl ist die OD<sub>600</sub> in erster Näherung proportional zur Zellgröße. So ergibt beispielsweise eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/mL eine OD<sub>600</sub> = 0,5 für haploide Bäckerhefe, aber nur 0,01 für *E. coli* ( $10^9$  Zellen/mL entsprechen einer OD<sub>600</sub> = 1). Dies bedeutet, eine Hemmung des Wachstums wie in Abb. 16 für die Clathrin-Deletionsmutanten kann grundsätzlich auf eine Hemmung der Zellvermehrung (hier Knospung) bei gleichzeitiger Stimulierung des Zellwachstums (Größenzunahme) zurückzuführen sein.

Tatsächlich konnte in den Clathrin-Deletionsmutanten eine Veränderung in Zellmorphologie und Zellgröße gegenüber Wildtypzellen beobachtet werden. In einer 8-10 h alten Flüssigkultur hatten Wildtypzellen eine typische Ei-Form und relativ häufig deutlich ausgebildete Knospen unterschiedlicher Größe. In der *CHC1*-Deletionsmutante waren nur wenige deutlich ausgebildete Knospen zu sehen, dagegen allerdings sehr viele Ansätze von beginnender Knospung und geringfügig größere Zellen. Ganz anders die *CLC1*-Deletionsmutante. Hier waren ähnlich viele mittelgroße bis große Knospen zu sehen wie im Wildtyp. Die Zellen der *CLC1*-Deletionsmutante waren deutlich größer, als die Wildtypzellen und eher rund als eiförmig (Abb. 17).



**Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen von intakten Zellen von Wildtyp (BY4741) und isogenen Clathrin-Deletionsmutanten ( $\Delta chc1$  und  $\Delta clc1$ )**

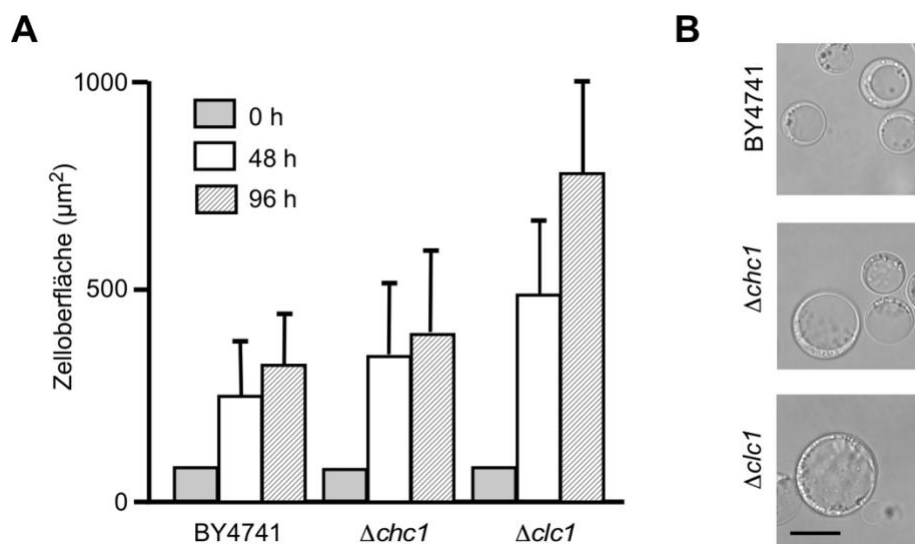
Intakte Zellen aus einer 10 h alten Flüssigkultur des Wildtyps (BY4741) zeigen die typische eiförmige Zellform mit vielen unterschiedlich großen Knospen, typisch für eine wachsende Kultur. Die Zellen der *CHC1*-Deletionsmutante ( $\Delta chc1$ ) erscheinen etwas größer, haben nur wenige Knospen aber viele Knospansätze (weiße Pfeilspitzen). Zellen der *CLC1*-Deletionsmutante ( $\Delta clc1$ ) sind deutlich größer als WT-Zellen, sind eher rund und haben häufig große Knospen (weiße Sterne). Größenmarker ist 10  $\mu$ m.

Daraus könnte man zumindest für die *CLC1*-Deletionsmutante eine Stimulierung des Zellwachstums durch Störung der Endocytose und dadurch bedingtes Ungleichgewicht zwischen Exocytose und Endocytoseaktivität, wie oben postuliert, ableiten.

Die große Zahl an großen Knospen in der *CLC1*-Deletionsmutante und die sehr geringe Anzahl von Knospen bei gleichzeitig großer Anzahl von Knospansätzen in der

*CHC1*-Deletionsmutante deuten auf eine Störung im Zellzyklus und/oder in der Zellseparierung hin, was beides letztlich in einer Hemmung der Zellvermehrung resultieren würde.

Betrachtet man das Verhalten der Protoplasten von Wildtypzellen und Zellen der Clathrin-Deletionsmutanten, so sieht man, dass die Deletion der Gene *CHC1* oder *CLC1* keinesfalls eine Hemmung des Wachstums bewirkt. Ganz im Gegenteil wachsen sowohl die Protoplasten der *CHC1*-Deletion, als auch die der *CLC1*-Deletion schneller als die Protoplasten der Wildtypzellen (Abb. 17A). Die Durchmesser von WT-Protoplasten nahmen in 96 h etwa von 5  $\mu\text{m}$  auf 10  $\mu\text{m}$  zu, was einer Oberflächenzunahme um etwa 235  $\mu\text{m}^2$  entspricht. Die Oberflächenzunahme der Clathrin-Deletionsmutanten war in diesem Zeitraum bei etwa 335  $\mu\text{m}^2$  ( $\Delta chc1$ ) und 700  $\mu\text{m}^2$  ( $\Delta clc1$ ) bei Protoplastendurchmessern nach 96 h von 11,5  $\mu\text{m}$  ( $\Delta chc1$ ) und 16  $\mu\text{m}$  ( $\Delta clc1$ ).

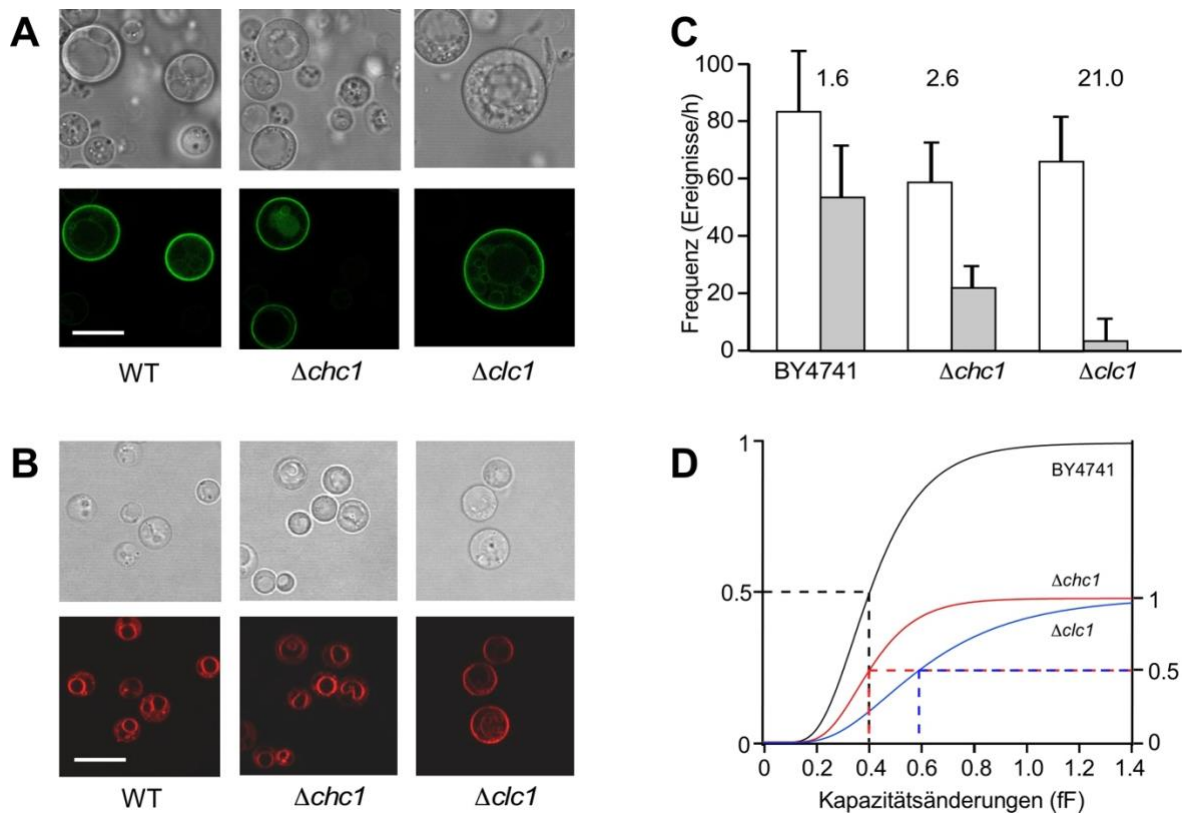


**Abbildung 18: Wachstum von Protoplasten aus Wildtypzellen und Zellen der Clathrin-Deletionsmutanten  $\Delta clc1$  und  $\Delta chc1$**

**A:** Oberflächenzunahme von WT,  $\Delta clc1$  und  $\Delta chc1$  Protoplasten in 48 h und 96 h. **B:** Mikroskopische Aufnahmen von Protoplasten nach 48 Stunden in Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose. Die Balken in A geben die Mittelwerte aus jeweils ca. 50 Protoplasten mit Standardabweichung an. Größenmaßstab ist 10  $\mu\text{m}$ .

Offensichtlich muss unterschieden werden zwischen Wachstum einer Zellkultur und Zellwachstum. Ebenso lassen die Wachstumsexperimente in Abb.16-18 vermuten, dass Chc1p und Clc1p unterschiedliche Funktionen und unterschiedlich große Bedeutung auf zellulärer Ebene haben. So hatte die Deletion von *CHC1* nur einen geringen Effekt auf das Wachstum der Protoplasten, während die Deletion von *CLC1* zu einer sehr starken Stimulierung des Protoplastenwachstums führte. Dies könnte grundsätzlich durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Exo- und Endocytose zugunsten der

exocytotischen Aktivität erklärt werden, wobei eine solche Verschiebung sowohl durch eine Stimulierung der exocytotischen Aktivität, als auch durch eine Hemmung der endocytotischen Aktivität erreicht werden kann. Um die Ursache für den moderaten Effekt der *CHC1*-Deletion und den starken Effekt der *CLC1*-Deletion auf das Protoplastenwachstum zu eruieren, wurde zunächst Exocytose und Endocytose in Wildtypzellen, sowie den Clathrinmutanten fluoreszenzoptisch untersucht (Abb. 19A und B).



**Abbildung 19: Fluoreszenzoptische und elektrophysiologische Untersuchung von Exocytose und Endocytose in WT,  $\Delta clc1$  und  $\Delta chc1$**

**A:** Plasmid-basierte Expression von Tok1-GFP in 48 h alten Protoplasten von WT und Clathrin-Deletionsmutanten. Die durch Tok1-GFP fluoreszierende Plasmamembran zeigt eine deutlich funktionale Exocytose der Protoplasten an. **B:** Internalisierung des Endocytosemarkers FM4-64 in 2 h alten Protoplasten. In WT und  $\Delta chc1$  ist eine deutliche Markierung der vakuolären Membran zu erkennen, während in  $\Delta clc1$  die Fluoreszenz hauptsächlich mit der Plasmamembran assoziiert ist. **C:** Frequenz der exocytotischen (weiße Balken) und endocytotischen Ereignisse (graue Balken) in Wildtyp (BY4741) und isogenen *CHC1*- bzw. *CLC1*-Deletionsmutanten aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten mit einer Gesamtmessdauer von jeweils 120 min. Die Zahlen an den Balken geben das jeweilige Verhältnis von exocytotischer und endocytotischer Aktivität ( $f_{ex}/f_{end}$ ) an. **D:** Bestimmung der Mediane der exocytotischen Ereignisse von Wildtyp und Clathrin-Deletionsmutanten. Die Kurven geben die kumulative Wahrscheinlichkeit der Verteilung der exocytotischen Ereignisse wie in Abb. 15B wieder. Der Median für die *CHC1*-Deletionsmutante ist identisch dem des Wildtyp (0,4 fF), während der der *CLC1*-Deletionsmutante mit 0,59 fF deutlich größer ist. Größenmarker in **A** und **B**: 10  $\mu m$ .

Dazu wurde der GFP-markierte Kaliumkanal Tok1p Plasmid-basiert in Protoplasten dieser Zellen exprimiert. In konfokal-mikroskopischen Aufnahmen konnte sowohl in 48 h alten Protoplasten von Wildtypzellen, als auch in Protoplasten der beiden Clathrin-Deletionsmutanten ( $\Delta chc1$ ,  $\Delta clc1$ ) eine deutliche und gleichmäßige Plasmamembran-ständige Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 19A).

Es war kein Unterschied in der Fluoreszenz zwischen den drei Präparationen zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Deletion in *CHC1* oder *CLC1* die Exocytose nicht merklich beeinflusst. Ein anderes Bild ergibt die fluoreszenzoptische Analyse der Endocytose durch Internalisierung des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs FM4-64. Frische Protoplasten (2 h alt) wurden für 30 min in Stabilisierungspuffer mit 20  $\mu$ M FM4-64 inkubiert, abzentrifugiert, in frischem Stabilisierungspuffer resuspendiert und nach 30 min mikroskopiert.

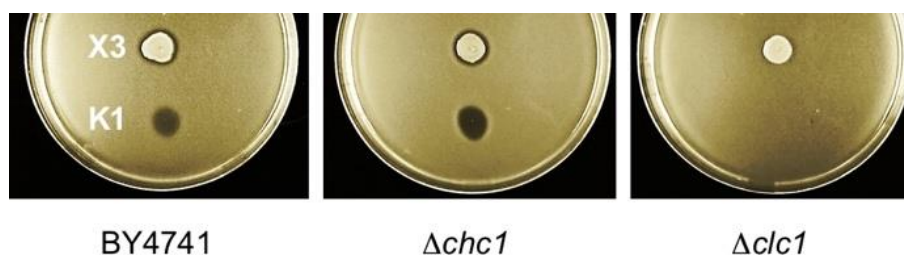
In Wildtyp-Protoplasten und in Protoplasten der *CHC1*-Deletionsmutante zeigte sich eine sehr ähnliche FM4-64 Lokalisation, die fast ausschließlich in der Vakuolenmembran zu finden war. Dagegen war in den Protoplasten der *CLC1*-Deletionsmutante die FM4-64 Fluoreszenz überwiegend in der Plasmamembran zu sehen (Abb. 19B). Dies deutet darauf hin, dass die *CHC1*-Deletionsmutante ähnliche endocytotische Aktivität aufweist wie die Wildtyp-Protoplasten, während die Endocytose in Protoplasten der *CLC1*-Deletionsmutante deutlich gestört ist.

In elektrophysiologischen Ableitungen der Membrankapazität konnte in Wildtyp-Protoplasten exocytotische und endocytotische Ereignisse mit einer Frequenz von 82  $\text{h}^{-1}$  bzw. 53  $\text{h}^{-1}$  und somit ein Verhältnis  $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}} = 1.6$  beobachtet werden (Abb. 19C). Die Clathrin-Deletionsmutanten zeigten vergleichbare exocytotische Aktivität ( $\Delta chc1$ : 58  $\text{h}^{-1}$ ;  $\Delta clc1$ : 64  $\text{h}^{-1}$ ), die etwas geringer war als die der Wildtypprotoplasten. Anders die endocytotische Aktivität. Die Frequenz der endocytotischen Ereignisse war in Protoplasten der *CHC1*-Deletionsmutante nur halb so groß wie in Wildtypprotoplasten (22  $\text{h}^{-1}$ ). Protoplasten der *CLC1*-Deletionmutante zeigte kaum endocytotische Ereignisse (3  $\text{h}^{-1}$ ). Daraus resultiert eine moderate Verschiebung des Exocytose/Endocytose-Gleichgewichts in der *CHC1*-Deletionsmutante ( $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}} = 2.6$ ), aber eine sehr starke Verschiebung zugunsten der exocytotischen Aktivität in der *CLC1*-Deletionsmutante ( $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}} = 21.0$ ). Durch Integration der Verteilungsfunktion konnten die mittleren Kapazitäten der exocytotischen Vesikel bestimmt werden. So war kein Unterschied zwischen Wildtyp und *CHC1*-Deletionsmutante zu sehen. Beide Verteilungen zeigten eine mittlere Kapazität (Median) von 0,4 fF (entspricht 126 nm). Dagegen scheinen die exocytotischen Vesikel in der *CLC1*-Deletionsmutante größer zu sein mit einem Median bei 0,59 fF, entsprechend einer Vesikelgröße von 153 nm (Abb. 19D). Eine entsprechende Bestimmung der Mediane

für die endocytotischen Vesikel konnte wegen der sehr geringen Zahl der Ereignisse insbesondere in der CLC1-Deletionsmutante nicht möglich.

#### 4.5. Clc1p-DEFIZIENTE HEFEN SIND IMMUN GEGEN K1 KILLERTOXIN

Viele Hefen, so auch *S. cerevisiae*, tragen doppelsträngige RNA-Viren in sich, die für sogenannte Killertoxine codieren. In *S. cerevisiae* sind drei verschiedene Killersysteme bekannt. Die durch die RNA-Viren M1, M2 und M28 codierten Killertoxine K1, K2 und K28 werden zunächst als Präpro-Toxine synthetisiert, posttranslational prozessiert und über den sekretorischen Weg ins Außenmedium abgegeben. Killerhefen (Hefen, die ein Killervirus tragen) sind gegen ihr eigenes Killertoxin immun, wohingegen Hefen, die keinen Killervirus in sich tragen durch das Killertoxin abgetötet werden. Die Mechanismen, die zur Immunität der Hefen gegen ihr eigenes Toxin führen ist ebenso weitgehend ungeklärt wie der Wirkmechanismus. Das Killertoxin K28 scheint an einen Zellwand-ständigen Rezeptor zu binden und durch Endocytose internalisiert zu werden. Im weiteren gelangt K28 schließlich in den Zellkern und führt zu einem Zellzyklus-Arrest und schließlich zum Tod der sensitiven Hefen. Für K1 wird ebenfalls ein Zellwand-ständiger Rezeptor postuliert (Breinig *et al.*, 2002; Breinig *et al.*, 2004), jedoch soll K1 in die Plasmamembran der sensitiven Hefen inserieren und dort Ionenkanäle ausbilden, sodass die sensitiven Hefen aufgrund der erhöhten Permeabilität der Plasmamembran und Kollabieren der Membranspannung zugrunde geht (Martinac *et al.*, 1990; Bussey, 1991). Diese Hypothese ist jedoch umstritten und keinesfalls belegt. Aufgrund der sehr starken Ähnlichkeit von K1 zum K28-Toxin stellte sich die Frage, ob K1 nicht vielleicht auch an die Zelle (Zellwand) bindet und durch Endocytose internalisiert wird.



**Abbildung 20: Killertoxin K1 wird in Killer-sensitiven Hefezellen möglicherweise durch Endocytose internalisiert**

Agarplatten mit einem Zellrasen von BY4741 und den beiden Clathrin-Deletionsmutanten. Der Zellrasen ist als gleichmäßige helle Fläche zu erkennen. Wildtyphefen BY4741 und die *CHC1*-Deletionmutante ( $\Delta chc1$ ) zeigten einen deutlichen Hemmhof (dunkler Ring) um die "Kolonie" des "Superkiller"-Stamms X3 und eine Wachstumshemmung durch isoliertes K1-Killertoxin (dunkler Fleck am unteren Rand der Agarplatte). Die *CLC1*-Deletionsmutante ( $\Delta clc1$ ) ist offensichtlich immun gegen das K1 Killertoxin, da weder durch den K1 produzierenden X3 Hefestamm, noch durch das isolierte Killertoxin eine Wachstumshemmung zu sehen war.

Um dies zu überprüfen, wurde die Sensitivität von Wildtyp BY4741 und den Clathrin-Deletionsmutanten  $\Delta chc1$  und  $\Delta clc1$  gegenüber Killertoxin K1 getestet. K1-Toxin wurde aus dem Hefestamm X3 (Novotná *et al.*, 2004), bekannt als "Superkiller", isoliert. Auf YPD-Agarplatten wurde ein Zellrasen von BY4741,  $\Delta chc1$  und  $\Delta clc1$  ausgebracht. Nach Antrocknen für ca. 30 min wurde zum einen 20  $\mu$ L einer Zellsuspension von X3, zum anderen 20  $\mu$ L des aus X3 isolierten K1-Killertoxins aufpipettiert. Die Agarplatten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert. Wildtyphefe BY4741 und die isogene *CHC1*-Deletionsmutante zeigten deutliche Sensitivität gegen den K1 produzierenden Hefestamm X3, sowie gegen das isolierte K1-Killertoxin (Abb. 20). In der unmittelbaren Umgebung des X3-Stammes war ein Hemmhof im Zellrasen von BY4741 und von  $\Delta chc1$  zu sehen. Ebenso war an der Stelle, an der K1-Killertoxin aufpipettiert wurde kein Wachstum des Zellrasens zu sehen. Dagegen war im Zellrasen von  $\Delta clc1$  weder in der Nachbarschaft von X3 noch an der Stelle an der K1 aufgetropft wurde eine Hemmung des Zellwachstums zu sehen. Da in der  $\Delta clc1$  Mutante, nicht aber in BY4741 und  $\Delta chc1$ , die endocytotische Aktivität weitestgehend ausgeschaltet ist (siehe Abb. 19), könnte durchaus ein kausaler Zusammenhang zwischen endocytotischer Aktivität und Sensitivität gegen Killertoxin bestehen.

#### **4.6. ENDOCYTOSE UND EXOCYTOSE WIRD MODULIERT DURCH DIE MEMBRANFLUIDITÄT**

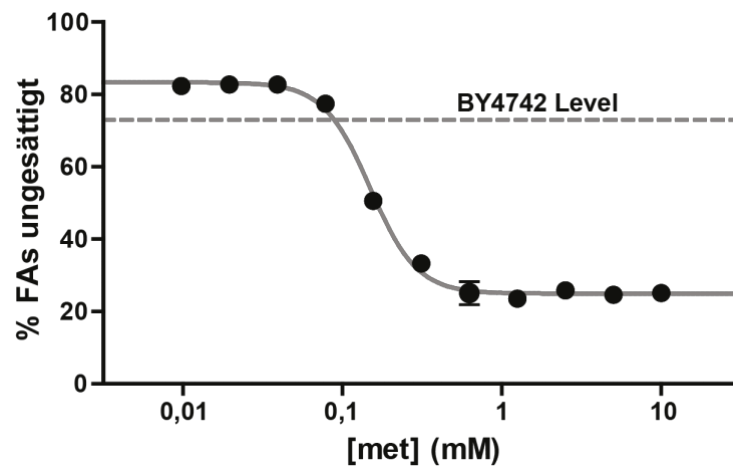
Die Membranfluidität wird maßgeblich von der Temperatur und der Lipidzusammensetzung der Membran bestimmt. Dabei spielt vor allem der Sättigungsgrad der Fettsäuren in den Phospholipiden und die Menge der eingelagerten Sterole, in der Bäckerhefe hauptsächlich Ergosterol und zu einem geringen Teil Zymosterol, eine große Rolle. Um den Einfluss der Lipidzusammensetzung und somit der Membranfluidität auf die Endocytose/Exocytose in der Bäckerhefe zu untersuchen, wurden zwei Hefestämme konstruiert, in denen die Menge an ungesättigten Fettsäuren, sowie die Menge an Ergosterol in der Membran gezielt variiert werden kann (Degreif, 2014; Degreif *et al.*, 2017; Degreif, 2018).

##### **4.6.1. MODULATION DURCH UNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN IN DER MEMBRAN**

Die Menge an ungesättigten Fettsäuren kann in der Bäckerhefe durch Modulation der Transkription des *OLE1*-Gens kontrolliert werden.

Ungesättigte Fettsäuren werden in der Bäckerhefe durch Ole1p gebildet. Ole1p ist die einzige Fettsäuredesaturase in diesem Organismus und wandelt CoA-gebundene Fettsäuren in ihre korrespondierenden  $\Delta 9$ -cis einfach-ungesättigten Spezies um. Um die Expression von *OLE1* kontrollieren zu können, wurde der endogene *OLE1*-Promotor durch den titrierbaren *MET3*-Promotor ersetzt. Dieser Promotor ist in Abwesenheit von Methionin

aktiv und wird durch mikromolare Methionin-Konzentrationen reprimiert. Der Gehalt an einfach-ungesättigten Fettsäuren (monounsaturated fatty acid: MUFA) in Abhängigkeit der externen Methioninkonzentration ist in Abb.21 dargestellt.



**Abbildung 21: Anteil der einfach-ungesättigten Fettsäuren im Hefestamm BCY1 (BY4742 *ole1::P<sub>MET3</sub>-OLE1*) in Abhängigkeit der Methioninkonzentration**

Der prozentuale Anteil der einfach ungesättigten Fettsäuren an der Gesamtheit der extrahierten Fettsäuren in BCY1 wurde durch GC-MS bestimmt (Degreif, 2018). Der verwendete Hintergrundstamm BY4742 wies einen Anteil an MUFAs von etwa 73% auf (gestrichelte Linie). Die Daten und die Abbildung wurden von D. Degreif zur Verfügung gestellt.

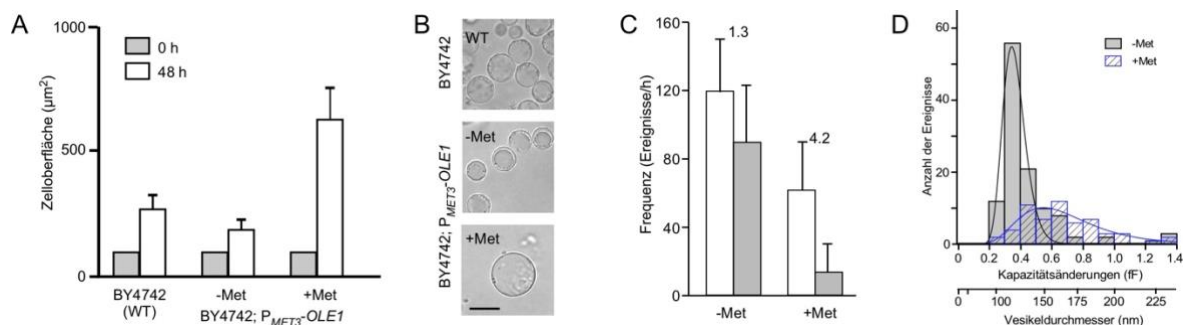
In dieser Abbildung wird deutlich, dass der Gehalt an MUFAs über einen weiten Methioninkonzentrations-Bereich von >80% in Abwesenheit von Methionin bis 25% in Anwesenheit von 1 mM Methionin titriert werden kann. Der Gehalt an MUFAs in nicht-modifizierten Wildtypzellen (BY4742) liegt bei etwa 73% (gestrichelte Linie in Abb. 21). Somit kann durch die externe Methioninkonzentration der Anteil an MUFAs sowohl leicht erhöht, als auch stark erniedrigt werden.

Das Wachstum von Protoplasten des Wildtyps BY4742 und des isogenen BCY1-Stammes wurde in Stabilisierungspuffer ohne Methionin oder mit 1 mM Methionin über einen Zeitraum von 120 h untersucht. Bereits nach 48 h war ein deutlicher Unterschied im Wachstum des Stammes BCY1 in Abwesenheit oder Anwesenheit von 1 mM Methionin zu sehen (Abb. 22A). Wildtypzellen zeigten im Zeitraum von 48 h eine Oberflächenzunahme von 170  $\mu\text{m}^2$ . In Abwesenheit von Methionin, also bei erhöhtem MUFA-Anteil, war das Protoplastenwachstum von BCY1 in 48 h geringer als das der Wildtypprotoplasten. In Anwesenheit von 1 mM Methionin, bei dem der *MET3*-Promotor maximal reprimiert ist und somit der MUFA-Anteil sehr gering ist (25%), war die Oberflächenzunahme mit 550  $\mu\text{m}^2$  etwa 5,5 mal so groß wie in Abwesenheit von Methionin. Betrachtet man die exocytotische und endocytotische Aktivität unter diesen Bedingungen, so zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp in Abwesenheit von Methionin eine geringe Verschiebung des Gleichgewichts von Exocytose/Endocytose von 1,6 zu 1,3. Das bedeutet, dass der Überschuss an



exocytotischer Aktivität geringer ist als in Wildtypzellen ohne Methionin-empfindliche *OLE1*-Expression. Dies ist konsistent mit der beobachteten geringeren Oberflächenzunahme des BCY1-Stammes in Abwesenheit von Methionin.

In Anwesenheit von 1 mM Methionin, also mit maximal reprimiertem *MET3*-Promotor, war zwar die exocytotische Aktivität deutlich reduziert (nur etwa  $60 \text{ h}^{-1}$ ), da aber gleichzeitig die endocytotische Aktivität sehr stark abnahm ( $14 \text{ h}^{-1}$ ) wurde das Gleichgewicht zwischen exocytotischer und endocytotischer Aktivität stark erhöht ( $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}} = 4,2$ ). Gleichzeitig war in Anwesenheit von 1 mM Methionin eine deutliche Verschiebung der Vesikelgröße exocytotischer Vesikel zu beobachten (Abb. 22D). Durch Integration der beiden Kurven wie in Abb. 15B (Inset) oder Abb. 19D konnten Mediane von 0,36 fF (entspricht Vesikeldurchmesser von 120 nm) in Abwesenheit von Methionin und 0,64 fF (entspricht Vesikeldurchmesser von 160 nm) in Anwesenheit von 1 mM Methionin bestimmt werden. Diese Erhöhung der Durchmesser exocytotischer Vesikel zusammen mit dem starken Ungleichgewicht zugunsten exocytotischer Aktivität ist eine gute Erklärung für das sehr starke Wachstum bei niederem MUFA-Anteil (BCY1 in Anwesenheit von 1 mM Methionin).

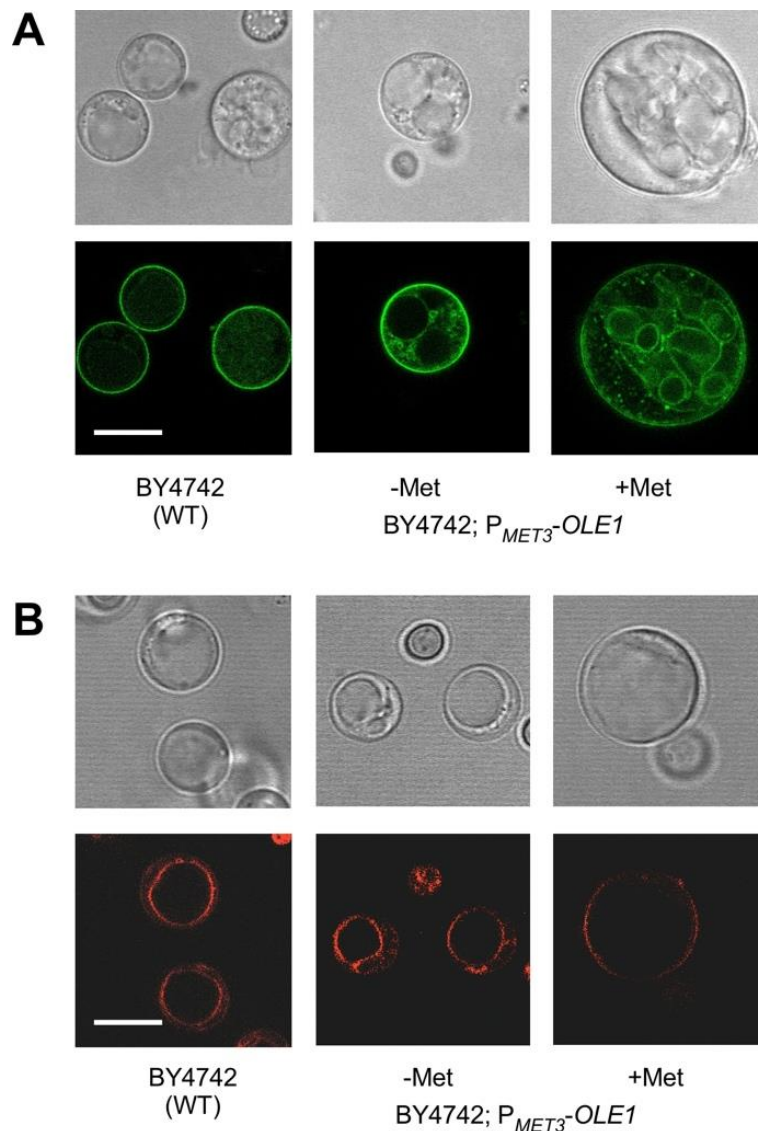


**Abbildung 22: Einfluss der *OLE1*-Expression auf die exocytotische und endocytotische Aktivität in Hefeprotoplasten**

**A:** Oberflächenzunahme in 48 h von WT und BCY1 Protoplasten in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 mM Methionin. **B:** Mikroskopische Aufnahmen von Protoplasten nach 48 Stunden in Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose. Größenmaßstab ist 10  $\mu\text{m}$ . **C:** Frequenz der exocytotischen (weiße Balken) und endocytotischen Ereignisse (graue Balken) in Wildtyp (BY4742) und isogenen BCY1-Stamm aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten mit einer Gesamtmessdauer von jeweils 60 min. Die Zahlen an den Balken geben das jeweilige Verhältnis von exocytotischer und endocytotischer Aktivität ( $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}}$ ) an. **D:** Verteilung der gemessenen Kapazitätsänderungen und somit der Vesikelgröße der exocytotischen Ereignisse in Abwesenheit (graue Balken) und Anwesenheit von 1 mM Methionin (schraffierte Balken). Die Kurven sind Angleichungen einer LogNormal-Verteilung an die experimentellen Daten. Die gemessenen Kapazitätsänderungen und die somit errechneten Vesikeldurchmesser waren in Anwesenheit von Methionin deutlich größer (Verschiebung des Peaks). Die Mediane konnten durch Integration der LogNormal-Funktion wie in Abb. 15 und 19 beschrieben mit 0,36 fF (ohne Methionin) und 0,64 fF (mit Methionin) bestimmt werden.

Durch Plasmid-basierte Expression von *TOK1*-GFP und mikroskopischer Kontrolle der subzellulären Lokalisation der GFP-Fluoreszenz konnte im BCY1-Stamm in Abwesenheit von Methionin und somit maximaler *OLE1*-Expression und hohem MUFA-Anteil ähnlich

gute Markierung der Plasmamembran beobachtet werden wie im Wildtyp. Dies bestätigt die in Abb. 22C gezeigte, gegenüber BY4742 unverändert hohe exocytotische Aktivität.



**Abbildung 23: Einfluss des MUFA-Anteils auf die Exocytose und Endocytose in Hefeprotoplasten**

**A:** Plasmid-basierte Expression von Tok1p-GFP in 96 h alten Protoplasten des WT und BCY1-Stamms in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 mM Methionin. Die durch Tok1-GFP fluoreszierende Plasmamembran zeigt eine deutlich funktionale Exocytose in Protoplasten von WT-Zellen und von BCY1-Zellen in Abwesenheit von Methionin an. In Anwesenheit von 1 mM Methionin ist zwar deutliche GFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran zu sehen, ein Großteil der Fluoreszenz war aber auch mit internen Membranen assoziiert. **B:** Internalisierung des Endocytosemarkers FM4-64 in 48 h alten Protoplasten. In WT und BCY1 ist in Abwesenheit von Methionin eine deutliche Markierung der vakuolären Membran zu erkennen, während in Anwesenheit von 1 mM Methionin die Fluoreszenz in BCY1-Protoplasten hauptsächlich mit der Plasmamembran assoziiert war. Größenmarker entspricht 10 µm.

Dagegen war im BCY1-Stamm in Anwesenheit von 1 mM Methionin und somit geringem MUFA-Anteil nur mäßige Fluoreszenz-Markierung der Plasmamembran. Ein signifikanter Teil der GFP-Fluoreszenz war in internen Membranen zu sehen. Dies ist ebenfalls konsistent mit der in Abb. 22C gezeigten schwächeren exocytotischen Aktivität in BCY1 mit maximal reprimierter *OLE1*-Expression.

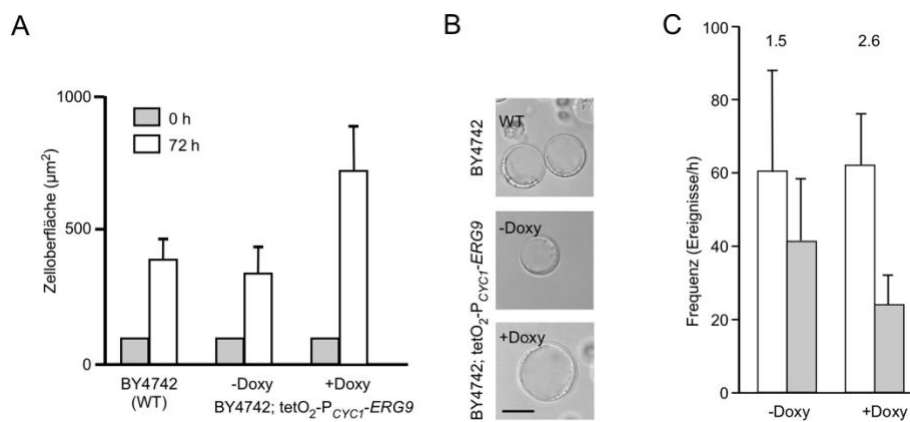
Der Einfluss der Lipidzusammensetzung der Membranen und somit der Membranfluidität auf die endocytotische Aktivität konnte fluoreszenzoptisch durch Internalisierung des lipophilen Farbstoffs FM4-64 untersucht werden (Abb. 23). Protoplasten (48 h alt) von Wildtyp BY4742 und BCY1-Zellen wurden für 30 min mit 20 µM FM4-64 inkubiert, zentrifugiert, in frischem Stabilisierungspuffer (+1% Glukose) resuspendiert und nach 30 min mikroskopiert. Wie bereits in Protoplasten von BY4741 (Abb. 13 und 19), so zeigte sich auch in Protoplasten von BY4742 erwartungsgemäß eine fast vollständige Markierung der Vakuolenmembran mit FM4-64. Es war kaum Fluoreszenz im Cytosol oder in der Plasmamembran zu sehen. Dies gilt auch für Protoplasten des BCY1-Stammes, wenn die Protoplasten in Abwesenheit von Methionin inkubiert wurden. In Anwesenheit von 1 mM Methionin war die Fluoreszenz dagegen überwiegend in der Plasmamembran verblieben, was darauf hindeutet, dass die Reprimierung der *OLE1*-Expression und somit der geringe MUFA-Anteil und die daraus resultierende geringe Membranfluidität die Endocytose deutlich inhibiert. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen aus den Wachstumsexperimenten (Abb. 22A,B) und den elektrophysiologischen Experimenten (Abb. 22C,D). Aus letzteren war abzuleiten, dass durch die Reprimierung der *OLE1*-Expression zwar die exocytotische Aktivität moderat reduziert wird, die endocytotische Aktivität aber fast vollständig zum Erliegen kommt.

#### **4.6.2. MODULATION DURCH STEROLGEHALT IN DER MEMBRAN**

Wie bereits in der Kapitel 2.1.2. erläutert, hat der Gehalt an Sterolen einen starken Einfluss auf die Fluidität einer Membran. Das vorherrschende Sterol in Hefemembranen ist Ergosterol, das in Pilzen als Pendant zum Cholesterol der tierischen Zellen angesehen werden kann. Neben Ergosterol findet man in den Membranen der Bäckerhefe auch noch geringe Anteile an Intermediaten des Ergosterol-Biosynthesewegs. Der Gesamtsterolgehalt in Hefe kann durch Modulation der *ERG9*-Transkription kontrolliert werden. *ERG9* codiert für die Squalensynthase (Erg9p), die in Eukaryoten die Kondensation von zwei Molekülen Farnesylpyrophosphat zu Squalen katalysiert und den ersten Schritt in dem von hier an linearen Biosyntheseweg darstellt, der in Pilzen zur Bildung von Ergosterol und in tierischen Zellen zu Bildung von Cholesterol führt. Ergosterol und Sphingolipide bilden in der Plasmamembran der Hefe räumlich diskrete Membranareale mit "liquid-ordered" Phasenverhalten. Diesen als Lipid-Rafts bezeichneten

Membranarealen wird eine wichtige Rolle in der lateralen Kompartimentierung der Plasmamembran, sowie auch in fundamentalen biologischen Prozessen wie Endocytose und Exocytose zugeschrieben.

Um den Sterolgehalt in Hefe zu modulieren und so die Rolle von Sterolen für die exocytotische und endocytotische Aktivität in Hefe zu untersuchen, wurde ein Hefestamm konstruiert, in dem der endogene *ERG9*-Promotor durch ein Doxycyclin-reprimierbares Promotorkonstrukt ( $\text{tetO}_2\text{-P}_{\text{CYC1}}$ ) ersetzt wurde (Degreif, 2018). Dieses Promotorkonstrukt ist ein sogenanntes Tet-Off System, bei dem *ERG9*-Expression durch Abwesenheit von Tetracyclin oder des Derivats Doxycyclin aktiviert und durch Anwesenheit von Tetracyclin/Doxycyclin reprimiert wird.

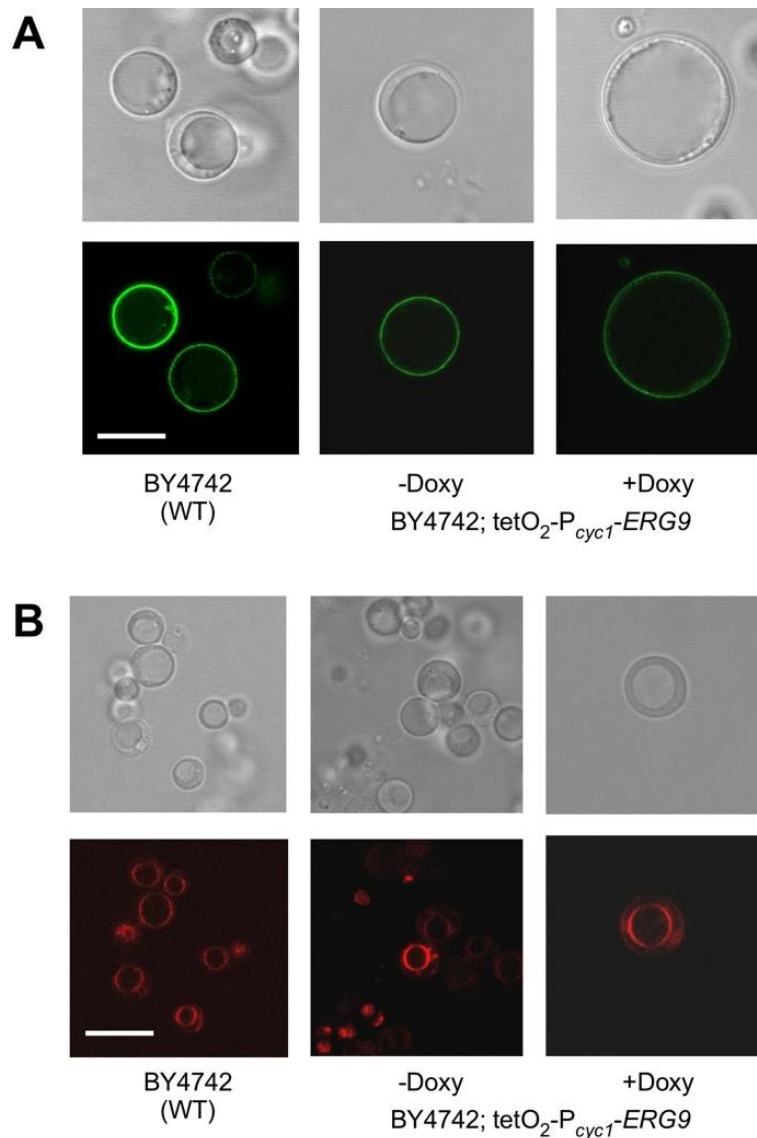


**Abbildung 24: Einfluss der *ERG9*-Expression auf die exocytotische und endocytotische Aktivität in Hefeprotoplasten**

**A:** Oberflächenzunahme in 72 h von WT (BY4742) und BCY2 Protoplasten in Abwesenheit und Anwesenheit von  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Doxycyclin. **B:** Mikroskopische Aufnahmen von Protoplasten nach 72 Stunden in Stabilisierungspuffer C + 1% Glukose. Größenmaßstab ist 10  $\mu\text{m}$ . **C:** Frequenz der exocytotischen (weiße Balken) und endocytotischen Ereignisse (graue Balken) im BCY2-Stamm mit oder ohne Doxycyclin aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten mit einer Gesamtmessdauer von jeweils 120 min. Die Zahlen oberhalb der Balken geben das jeweilige Verhältnis von exocytotischer und endocytotischer Aktivität ( $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}}$ ) an.

Das Wachstum von Protoplasten des Wildtyp (BY4742) und des isogenen BCY2-Stammes in Stabilisierungspuffer (+1% Glukose) wurde über mehrere Tage verfolgt. Dabei zeigten Wildtypprotoplasten und Protoplasten von BCY2, die in Abwesenheit von Doxycyclin in Stabilisierungspuffer inkubiert wurden ein ähnliches Wachstum mit einer Oberflächenzunahme in 72 h von  $290 \mu\text{m}^2$  (BY4742) und  $250 \mu\text{m}^2$  (BCY2). Dagegen war die Oberflächenzunahme von BCY2 in Anwesenheit von  $40 \mu\text{M}$  Doxycyclin und somit reprimierter *ERG9*-Expression mit  $600 \mu\text{m}^2$  im selben Zeitraum deutlich größer (Abb. 24A,B). In Abwesenheit von Doxycyclin zeigte der BCY2-Stamm exocytische und endocytotische Aktivität, die mit  $f_{\text{ex}} = 60 \text{ h}^{-1}$  und  $f_{\text{end}} = 40 \text{ h}^{-1}$  geringfügig geringer war als die Aktivität im Wildtyp (Abb. 24C). Das Verhältnis von  $f_{\text{ex}}/f_{\text{end}} = 1,5$  war sehr nahe an dem Wert von 1,6 für Wildtypprotoplasten. Reprimierung der *ERG9*-Expression hatte keinen Einfluss

auf die exocytotische, wohl aber auf die endocytotische Aktivität. Diese sank von  $f_{end} = 40 \text{ h}^{-1}$  (ohne Doxycyclin) auf  $f_{end} = 23 \text{ h}^{-1}$ , was in einem Quotienten von 2.6 resultiert. Dieser fast verdoppelte  $f_{ex}/f_{end}$  Quotient erklärt das gesteigerte Wachstum der BCY2-Protoplasten bei reprimierter *ERG9*-Expression (Anwesenheit von Doxycyclin).



**Abbildung 25: Einfluss des Sterolgehalts auf die Exocytose und Endocytose in Hefeprotoplasten**

**A:** Plasmid-basierte Expression von Tok1p-GFP in 72 h alten Protoplasten des WT und BCY2-Stamms in Abwesenheit und Anwesenheit von  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Doxycyclin. Die durch Tok1p-GFP fluoreszierende Plasmamembran zeigt eine deutlich funktionale Exocytose in Protoplasten von WT-Zellen und von BCY2-Zellen in Abwesenheit und in Anwesenheit von Doxycyclin. **B:** Internalisierung des Endocytosemarkers FM4-64 in 2 h alten Protoplasten. In WT und BCY2 in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxycyclin ist eine deutliche Markierung der vakuolären Membran zu erkennen. Größenmarker entspricht  $10 \mu\text{m}$ .

Durch Plasmid-basierte Expression von *TOK1*-GFP und mikroskopischer Kontrolle der Lokalisation der GFP-Fluoreszenz konnte im BCY2-Stamm sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von Doxycyclin ähnlich gute Markierung der Plasmamembran beobachtet werden wie im Wildtyp (Abb. 25). Die Fluoreszenz war fast ausschließlich in der Plasmamembran zu sehen. Dies ist konsistent mit den elektrophysiologischen Experimenten, in denen in BCY2-Protoplasten unabhängig von der *ERG9*-Expression nur eine geringfügig niedrigere exocytotische Aktivität als im Wildtyp gemessen wurde. Die Ergosterol-Dotierung und somit die Bildung von Lipid-Rafts scheint keinen Einfluss auf die exocytotische Aktivität zu haben.

Auch die fluoreszenzoptische Überprüfung der Endocytose mittels Internalisierung des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs FM4-64 deutete darauf hin, dass die Endocytose weitgehend unabhängig von der *ERG9*-Expression ist. In allen drei Ansätzen war eine deutliche Fluoreszenzmarkierung der Vakuolenmembran zu beobachten und nur unwesentliche Mengen an fluoreszierendem Material in Plasmamembran oder Cytosol.

Zwar wurde in den elektrophysiologischen Experimenten eine Reduktion der endocytotischen Aktivität um etwa 40% durch Reprimierung der *ERG9*-Expression und damit eine Verschiebung des  $f_{ex}/f_{end}$  Verhältnisses von 1,5 auf 2,6 beobachtet werden, dennoch war mit einer Frequenz von  $f_{end} = 23 \text{ h}^{-1}$  deutliche endocytotische Aktivität verbleibend, sodass zwar eine Steigerung des Protoplastenwachstums durch das stärkere Ungleichgewicht zugunsten exocytotischer Aktivität erfolgt, die Endocytose, gezeigt durch die Internalisierung von FM4-64, aber dennoch gewährleistet bleibt.

## 5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden exocytotische und endocytotische Aktivität in der Bäckerhefe mit elektrophysiologischen und mikroskopischen Methoden untersucht. Die Balance zwischen exocytotischer und endocytotischer Aktivität ist wichtig für eine ganze Reihe von bedeutenden physiologischen Prozessen in einer Zelle, wie z.B. für Prozesse an denen Rezeptoren und Signalweiterleitung oder Ausschüttung von Signalstoffen beteiligt sind. Ein wichtiger Prozess in der Bäcker- oder Knosphefe, bei dem sowohl exocytotische, als auch endocytotische Aktivität eine Rolle spielt, ist die Paarung.

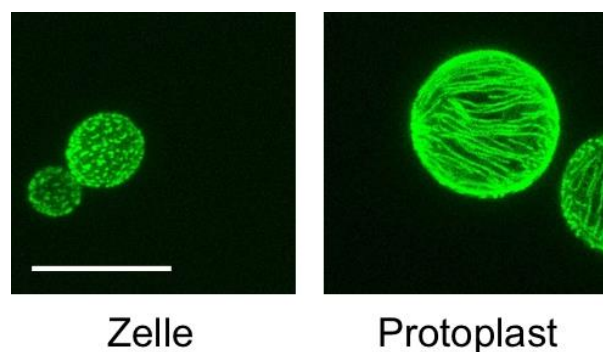
Hefezellen mit dem Paarungstyp *Mat- $\alpha$*  sezernieren das Pheromon  $\alpha$ -Faktor ins Außenmedium (Exocytose). Das Pheromon bindet an den  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor (Ste2p) einer kompatiblen Zelle mit dem Paarungstyp *Mat-a* und wird zusammen mit dem  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor internalisiert (Endocytose). Ste2p, ein 7-TM G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), interagiert dabei sowohl mit dem Pheromon, als auch mit einem heterotrimeren G-Protein und initiiert so eine Signalkaskade, die zu einem polaren Wachstum und letztlich zur Paarung der beiden kompatiblen Zellen führt.

### 5.1. WACHSTUM UND OBERFLÄCHENVERGRÖßERUNG

Polares Wachstum resultiert in einer Volumenvergrößerung und somit auch einer Vergrößerung der Zelloberfläche, also einer Vergrößerung der Plasmamembranoberfläche. Polares Wachstum in Hefe ist auch im Zuge der vegetativen Vermehrung zu beobachten. Bäcker- oder Knosphefen vermehren sich durch Knospung, wobei an einer Stelle der Mutterzelle eine Knospe angelegt wird, die dann wächst, während die Mutterzelle nicht mehr an Größe zunimmt. Ist die Tochterzelle annähernd so groß wie die Mutterzelle, so trennt sie sich von dieser ab.

Die Oberflächenvergrößerung im Zuge des Zellwachstums (hier polares Wachstum) könnte grundsätzlich durch Lockerung der Zellwand und osmotisch bedingter Volumenzunahme erfolgen, wobei die notwendige Oberflächenvergrößerung durch Dehnung der Plasmamembran erfolgen könnte. Hefekulturen zeigen eine Verdopplungszeit von etwa 90 min. Das bedeutet, dass die Membranoberfläche einer Hefezelle in 90 min um 100% vergrößert wird. Quantitative Untersuchungen an Pflanzenprotoplasten zur mechanischen Verformbarkeit und Dehnung von biologischen Membranen haben jedoch gezeigt, dass durch Dehnung maximal 2-3% an Oberflächenvergrößerung möglich ist (Wolfe and Steponkus, 1983). In tierischen Zellen scheinen verschiedene Strukturen wie die Cholesterol und Sphingolipid-reichen Caveolen als Membranreservoirs zu dienen, die schnelle (<1 min), aber auch nur kleine (etwa 1%) Oberflächenvergrößerungen ermöglichen

(Gauthier *et al.*, 2012). Solche Strukturen sollen in Zellen mit Zellwand (Pflanzen und Pilze) aufgrund des hohen Turgordrucks nicht ausgebildet werden können (Rowghanian and Campàs, 2017), sodass diese Zellen fast ausschließlich auf endocytotische und exocytotische Aktivität zur Anpassung der Membranoberfläche angewiesen seien. In der Bäckerhefe finden sich jedoch ebenfalls Sterol und Sphingolipid-reiche Membranamikrodomänen, die Membraneinfaltungen bilden und als Reservoirs für schnelle Ausdehnung fungieren können. Diese sogenannten Eisosomen bilden kleine ( $\varnothing \approx 100$  nm) Areale der Plasmamembran (Moreira *et al.*, 2009), die offensichtlich wichtig sind für schnelle ( $<10$  min) osmotisch induzierte Protoplastenexpansion (Kabeche *et al.*, 2015).



**Abbildung 26: Eisosomen in intakte Zellen und Protoplasten von Wildtyphefe (BY4742)**

CLSM-Aufnahmen in der Maximal-Projektion (20 Stacks) von intakten Zellen und 24 h alte Protoplasten, die das Eisosomen-Markerprotein Pil1p mit C-terminalem GFP Plasmid-basiert exprimieren. In intakten Zellen erscheinen Eisosomen als kleine Punkt-förmige Areale, die in Protoplasten zu langgezogenen "Filamenten" entfaltet erscheinen. Größenmarker ist 10  $\mu$ m. Die Aufnahmen wurden von Chris Sprengel zur Verfügung gestellt.

Diese Invaginationen, die durch Fluoreszenzmarkierung des Zeigerproteins Pil1p als kleine Areale in der Plasmamembran sichtbar gemacht werden können, sind an frischen Protoplasten bereits entfaltet und können daher für das langsame (24-96 h) Protoplastenwachstum keine Rolle spielen. Zudem waren die Oberflächenzunahmen, die auf die Entfaltung von Eisosomen zurückgeführt werden könnten mit 20-30% (Kabeche *et al.*, 2015) um Größenordnungen zu klein, um die Beobachtungen aus der hier vorliegenden Arbeit erklären zu können. Das Protoplastenwachstum, wie es in dieser Arbeit mehrfach gezeigt wurde, ist daher eher auf ein Ungleichgewicht zwischen Exocytose und Endocytose zurückzuführen. Wird dieses Gleichgewicht zugunsten der exocytotischen Aktivität verschoben, sei es durch Stimulierung der Exocytose oder durch Hemmung der Endocytose, so ist ein Zellwachstum zu erwarten.



## 5.2. ENDO-/EXOCYTOSE UND PROTOPLASTENWACHSTUM IN CLATHRIN-DELETIONSMUTANTEN

Endocytose erfolgt in der Bäckerhefe über einen Clathrin-vermittelten oder über einen Clathrin-unabhängigen, Rho1p/Bni1p-abhängigen Weg (Prosser *et al.*, 2011; Weinberg and Drubin, 2012). Um diese beiden Wege zu trennen, wurden die beiden Gene (*CLC1* und *CHC1*), die für die Clathrin-Strukturproteine Clc1p und Chc1p codieren, deletiert und die Auswirkungen auf die Endocytose untersucht. Dabei lieferten Experimente zum Wachstum von Zellsuspensionskulturen und zum Wachstum individueller Zellen sich widersprechende Ergebnisse. Während das Wachstum einer Suspensionskultur der Clathrin-Deletionsmutanten gegenüber einer Wildtypkultur deutlich gehemmt war, zeigten die Clathrinmutanten ein stärkeres Wachstum der einzelnen Zellen, als Wildtypzellen. Wie ist dieser scheinbare Widerspruch zu erklären?

Das Wachstum einer Hefekultur, das üblicherweise in Form einer Änderung der Absorption bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen wird, beruht auf der vegetativen Vermehrung der Zellpopulation. Dies setzt einen intakten Zellzyklus voraus. Das Wachstum einer individuellen Zelle ist jedoch nicht abhängig von einem kompletten und intakten Zellzyklus, sondern von einem intakten Stoffwechsel und damit verbundener Produktion von Biomasse. Dies resultiert in einer Volumenzunahme (Oberflächenzunahme).

Die Daten in Abb. 17 geben Hinweise für Störungen im Zellzyklus der Clathrin-Deletionsmutanten, was das langsamere Wachstum der Suspensionskulturen erklären würde. Sowohl die  $\Delta chc1$ -, als auch die  $\Delta clc1$ -Mutante zeigte abnorme Zellmorphologie. In der  $\Delta chc1$ -Suspension waren nur wenige Knospen, aber viele Knospansätze sichtbar. Dagegen waren in der  $\Delta clc1$ -Suspension ähnlich viele Knospen wie im Wildtyp zu sehen, die allerdings überwiegend sehr groß waren. Zudem waren die Zellen der  $\Delta clc1$ -Mutante deutlich größer, als die Wildtypzellen. Dies deutet darauf hin, dass beide Mutanten eine Störung im Zellzyklus haben, wobei die  $\Delta chc1$ -Mutante ein Problem bei der Knospung zu haben scheint, während die Störung in der  $\Delta clc1$ -Mutante eher in der Zellseparierung (Ablösen der Tochterzelle) liegen dürfte. Interessant ist die diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass die Deletionen in den beiden Clathrin-Genen, *CHC1* und *CLC1*, unterschiedliche Auswirkungen auf vegetative Vermehrung (Abb. 16) und Zellzyklus (Abb. 17) haben.

Im Gegensatz zu Wachstumshemmung auf der Ebene der Zellpopulation konnte auf der Einzelzellebene eine Stimulierung des Wachstums in Protoplasten der Clathrin-Deletionsmutanten beobachtet werden. Die Ergebnisse der direkten Messung von endocytotischer und exocytotischer Aktivität in Form von Kapazitätsmessungen geben eine Erklärung für das gesteigerte Zellwachstum der Clathrin-Deletionsmutanten. Wie für die Deletion in den Genen *CHC1* und *CLC1*, die für die Clathrin-Strukturproteine codieren,

erwartet, zeigten die Clathrin-Deletionsmutanten eine deutlich reduzierte endocytotische Aktivität, während die exocytotische Aktivität nur leicht reduziert war. Allerdings war auch in den elektrophysiologischen Ableitungen ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Mutanten zu erkennen. Die Hemmung der endocytotischen Aktivität war in der  $\Delta clc1$ -Mutante deutlich stärker, als in der  $\Delta chc1$ -Mutante. Da die *CLC1*-Deletion gleichzeitig eine Vergrößerung der sekretorischen Vesikel zur Folge hatte, war in dieser Mutante die Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Exocytose wesentlich stärker, als in der  $\Delta chc1$ -Mutante, was sich auch in einem deutlich stärkeren Protoplastenwachstum der  $\Delta clc1$ -Mutante niederschlägt.

Unterschiedlich starke Auswirkungen von *CHC1*- und *CLC1*-Deletion wurde bereits mehrfach berichtet. So konnte gezeigt werden, dass Clc1p-Überexpression den Defekt in der Endocytose einer *CHC1*-Deletionsmutante teilweise aufheben und die Chc1p-Funktion partiell übernehmen kann (Newpher *et al.*, 2006). Andererseits kann Clc1p in Hefe wohl unabhängig von Chc1p funktionieren (Huang *et al.*, 1997). Zwar sind beide, Clc1p und Chc1p, an der Ausbildung des Clathrinmantels beteiligt, jedoch scheint Clc1p essentiell für die Trimerisierung von Chc1p zu sein. Ohne Clc1p kann das Clathringerüst nicht assembliert werden, es werden keine Clathrin-ummantelten Vesikel gebildet und die Clathrin-vermittelte Endocytose kommt zu erliegen (Chu *et al.*, 1996). Eine sehr wichtige Funktion kommt Clc1p auch bei der Anbindung von Actin an die Membran zu. Die Invagination der Plasmamembran ist Actin-abhängig, wobei Actin an den Clathrinmantel binden muss. Dies geschieht jedoch nicht durch direkte Bindung von Actin an das Clathringerüst. Eine Schlüsselrolle spielt dabei Sla2p, das zum einen mit frühen Coat-Proteinen (Ede1p, Pal1p) interagiert, zum anderen durch Interaktion mit Clc1p die Rekrutierung von Sla1p und die späteren Schritte der Endocytose maßgeblich beeinflusst. Sla2p hat eine N-terminale Membranbindedomäne, eine zentrale *coiled-coil* Region, die Clc1p bindet, und eine C-terminale Actin-Bindedomäne (Goode *et al.*, 2015). In Sla2p-defizienten Hefen ist eine unkontrollierte Actin-Polymerisation ohne Vesikelbildung zu beobachten, sodass in Abwesenheit von Sla2p die Actin-Polymerisation offensichtlich von der Membraninvagination und Vesikelbildung entkoppelt ist (Kaksonen *et al.*, 2003; Newpher *et al.*, 2005; Newpher and Lemmon, 2006; Newpher *et al.*, 2006).

### 5.3. MODULATION DER ENDO-/EXOCYTOSE DURCH DIE LIPIDZUSAMMENSETZUNG

Im Hefestamm BCY1 ist der endogene *P<sub>OLE1</sub>*-Promotor durch den reprimierbaren *P<sub>MET3</sub>*-Promotor ersetzt. Dies erlaubt durch Zugabe von Methionin im Aussenmedium, die *OLE1*-Expression Methionin-abhängig zu steuern und so den Anteil einfach-ungesättigter Fettsäuren (**monounsaturated fatty acid** = MUFA) in den Phospholipiden der Membranen

über einen weiten Bereich zu variieren. Durch hohe Methionin-Konzentrationen im Aussenmedium kann der Anteil der MUFAs auf etwa 25% reduziert werden, während der Anteil in Methionin-freiem Medium bei etwa 80% liegt. Die Absenkung des Anteils ungesättigter Fettsäuren in den Membranen führt zu einer deutlichen Reduzierung der Membranfluidität (Degreif *et al.*, 2017; Degreif, 2018) und somit zu einer Änderung der mechanischen Eigenschaften der Membranen. In Fütterungsversuchen an Maus Macrophagen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Verhältnisses von gesättigten/mehrfach-ungesättigten Fettsäuren um den Faktor 2 einen deutlichen Effekt auf die Endocytose zur Folge hat. Der steigende Grad der Phospholipid-Sättigung korrelierte in diesen Experimenten mit einer sinkenden Endocytoserate (Mahoney *et al.*, 1977). Ein kausaler Zusammenhang zwischen Membranfluidität und Endocytoserate konnte auch in Pflanzen gezeigt werden. Die Aluminium-Toxizität ist der wichtigste limitierende Faktor in der Nutzpflanzenproduktion auf sauren Böden. Das Hauptsymptom der Aluminium-Toxizität in Pflanzen ist eine rasche Hemmung des Wurzelwachstums, das mit einer Erniedrigung der Membranfluidität und einer Hemmung der Endocytose einhergeht. Diese Symptome konnten durch externe Gabe von Membran-fluidisierenden Agenzien wie Benzyl-Alkohol rückgängig gemacht werden (Krtková *et al.*, 2012). Diese Beobachtungen der Korrelation von geringer Membranfluidität und Hemmung der Endocytose ist absolut kompatibel mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. Interessanterweise, ist jedoch durch die Reprimierung der *OLE1*-Expression und einhergehender Erniedrigung der Membranfluidität nicht nur die Endocytose-Aktivität reduziert, sondern in ähnlichen Maße auch die Exocytose.

Obwohl schon seit Jahrzehnten bekannt ist, dass Phospholipasen und ungesättigte Fettsäuren eine entscheidende Rolle in der Exocytose in tierischen System spielen, sind die Mechanismen bislang weitestgehend unklar. Eine Regulation durch direkte Interaktion ungesättigter Fettsäuren mit SNARE-Proteinen soll die Vesikelfusion mit der Plasmamembran und somit die Exocytose stimulieren (Darios and Davletov, 2006). Dies würde bedeuten, die Modulation der Exocytoseaktivität wäre eher auf eine spezifische Fettsäure/Protein Interaktion, als auf eine unspezifische mechanische Modulation (Membranfluidität) zurückzuführen. Finale Schritte der Exocytose in der Bäckerhefe beinhalten auch Interaktionen von Proteinen des Exocyst (Sec3p und Exo70p) mit Lipiden in spezifischen Regionen der Plasmamembran und erleichtern so die Vesikelfusion (Smindak *et al.*, 2017), sodass hier durchaus die Art der Phospholipide oder die Asymmetrie der Plasmamembran eine entscheidende Rolle spielen könnte.

#### 5.4. DIE ROLLE VON STEROLEN BEI ENDOCYTOSE UND EXOCYTOSE

In einem ähnlichen Ansatz, wie oben für die *OLE1*-Expression beschrieben, wurde ein Hefestamm generiert, in dem der endogene  $P_{ERG9}$ -Promotor durch ein Tetracyclin/Doxycyclin-reprimierbares  $tetO_2$ - $P_{CYC1}$ -Promotorkonstrukt ersetzt wurde. Dieses Konstrukt erlaubt die Modulation des Gesamtsterolgehalt in der Zelle durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin im Aussenmedium.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene signifikante Reduktion der endocytotischen Aktivität durch Absenken des Sterol/Ergosterol-Gehalts ist konsistent mit Beobachtungen an tierischen Systemen und verdeutlicht die wichtige Rolle von Sterolen für die Endocytose (Subtil *et al.*, 1999). Ähnlich wie in tierischen Systemen das Cholesterol, so ist in der Bäckerhefe Ergosterol in Membranmikrokompartimenten, den sogenannten Lipid Rafts, angereichert. Diesen Membranmikrodomänen wird eine wichtige Rolle in der Endocytose zugeschrieben. Allerdings sind die Berichte z.T. widersprüchlich. So werden Ergosterol-reiche Membranmikrodomänen, sogenannte Eisosomen, einerseits als Startpunkte für die Endocytose angesehen (Walther *et al.*, 2006), andererseits wurde berichtet, dass Proteine in diesen Membranmikrodomänen (MCC) vor Internalisierung und Abbau geschützt seien (Grossmann *et al.*, 2008) und Proteine der endocytotischen Maschinerie von diesem Mikrokompartiment ausgeschlossen seien (Grossmann *et al.*, 2008; Strádalová *et al.*, 2009; Malinsky *et al.*, 2010). Diese Berichte würden einen Mechanismus mit spezifischer Interaktion von Proteinen der endocytotischen Maschinerie mit Sterolen in diesen Kompartimenten eher ausschließen. Da jedoch gezeigt wurde, dass Hefemutanten mit Defekten in Genen die für Enzyme des Ergosterolbiosynthesewegs codieren (*ERG2*, *ERG6*) starke Defekte in der endocytotischen Aktivität aufweisen (Munn, 2001), erscheint auch eine weniger spezifische Rolle von Sterolen in der Endocytose möglich. So könnten Eigenschaften wie Membranfluidität oder spezifische Membrangeometrie (Krümmung), die durch die Dotierung der Membran mit Sterolen beeinflusst werden, durchaus eine prominente Rolle für eine intakte Endocytose spielen. So ist bekannt, dass Hefestämme mit einem Defekt in der Sterol/Ergosterol-Biosynthese eine ungewöhnlich niedere Membranfluidität aufweisen (Lees *et al.*, 1979) und diese geringe Membranfluidität korreliert mit Defekten in der Membraninternalisation (Munn, 2001).

Diese Vorstellung wäre auch absolut kompatibel mit den in dieser Arbeit beschriebenen Inhibition der endocytotischen Aktivität durch Reprimierung der *OLE1*-Expression und daraus resultierender Erniedrigung der Membranfluidität.

Anders als die Reprimierung der *OLE1*-Expression resultierte die Reprimierung von *ERG9* lediglich in einer Inhibition der Endocytose, wobei die exocytotische Aktivität nicht beeinflusst wurde. Dies würde gegen einen einfachen Mechanismus wie die allgemeine

Membranfluidität sprechen, weshalb ein Model vorgeschlagen wird, in dem Sterole/Ergosterol sowohl spezifische Protein/Lipid Interaktionen, als auch physikochemische Parameter wie Membranfluidität und Membrangeometrie beeinflussen und Änderungen dieser Parameter durch Modulation des Ergosterolgehalts die endocytotische Aktivität reguliert.

### **5.5. HEFEPROTOPLASTEN ALS MESSYSTEM**

Elektrophysiologische Ableitung mit der Patch-Clamp Technik erfordert freien Zugang der Meßpipette zur Plasmamembran. Dies wiederum erfordert in der Bäckerhefe enzymatischen Verdau der Zellwand. Durch Wachstumsexperimente konnte gezeigt werden, dass die resultierenden Protoplasten Stoffwechsel-aktiv sind und über mehrere Tage (bis zu 8 Tage) grundlegende physiologische Prozesse wie Transkription, Translation, Endocytose und Exocytose aufrechterhalten. Diese Protoplasten eignen sich ausgezeichnet, um subzelluläre Lokalisation und Dynamik von Membranproteinen zu studieren. Die Protoplasten bilden unter den experimentellen Bedingungen keine neue Zellwand und zeigen keine vegetative Vermehrung in Form von Knospung und Teilung, sodass beispielsweise ein GFP-markiertes Membranproteine exprimiert, die Expression dieses Fusionsproteins dann gestoppt und die Stabilität des Proteins in der Membran über einen längeren Zeitraum studiert werden kann. Dies erlaubt Untersuchungen zum Protein-Turnover, da das fluoreszierende Protein nicht durch Zellteilung und Verteilung auf Mutter- und Tochterzelle verteilt und so permanent verdünnt wird.

Der Nachteil des Systems Hefeprotoplasten ist die Beobachtung, dass die Protoplasten ganz offensichtlich im Zellzyklus arrestiert sind. Indiz dafür ist die Beobachtung, dass Protoplasten selbst nach mehreren Tagen nur 1 oder 2 Zellkerne aufweisen (Abb. 14). Inwiefern dies auf eine unzureichende Nährstoffversorgung zurückzuführen ist, müsste überprüft werden. Protoplasten werden üblicherweise in einer Salzlösung mit Glucose als Kohlenstoffquelle inkubiert. Eventuell sollte versucht werden, die Protoplasten in einem Vollmedium (z.B. YPD) supplementiert mit einem Osmotikum zu inkubieren. Ob die Protoplasten dann vielkernig werden und ob sie dann für elektrophysiologische Experimente überhaupt noch geeignet sind, bleibt zu eruieren.

## 6. LITERATUR

- Bagnat, M., Chang, A., and Simons, K. (2001) Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 4129–4138.
- Berchtold, D., and Walther, T.C. (2009) TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Molecular Biology of the Cell* **20**: 1565–1575.
- Bernstein, J. (1912) *Elektrobiologie: Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt*. Vieweg+Teubner Verlag.
- Bertl, A., and Gradmann, D. (1987) Current-voltage relationships of potassium channels in the plasmalemma of *Acetabularia*. *J Membrane Biol* **99**: 41–49.
- Bertl, A., and Slayman, C.L. (1990) Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccharomyces*: dependence on calcium, redox state, and voltage. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7824–7828.
- Bertl, A., and Slayman, C.L. (1992) Complex modulation of cation channels in the tonoplast and plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: single-channel studies. *J Exp Biol* **172**: 271–287.
- Besterman, J.M., and Low, R.B. (1983) Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochemical Journal* **210**: 1–13.
- Bois-Reymond, Du, E. (1848) Untersuchungen über thierische Elektrizität. *Annalen der Physik* **151**: 463–464.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153–166.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115–132.
- Breinig, F., Schleinkofer, K., and Schmitt, M.J. (2004) Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology* **150**: 3209–3218.
- Breinig, F., Tipper, D.J., and Schmitt, M.J. (2002) Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* **108**: 395–405.
- Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C., and Wakeham, D.E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 517–568.
- Bussey, H. (1991) K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol* **5**: 2339–2343.
- Carman, G.M., and Han, G.-S. (2009) Regulation of phospholipid synthesis in yeast. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S69–73.
- Caro, L.G., and Palade, G.E. (1964) Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J Cell Biol* **20**: 473–495.

- Carrillo, L. (2015) Application of high-resolution membrane capacitance measurements in the study of exocytosis and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. 1–95.
- Carrillo, L., Cucu, B., Bandmann, V., Homann, U., Hertel, B., Hillmer, S., *et al.* (2015) High-resolution membrane capacitance measurements for studying endocytosis and exocytosis in yeast. *Traffic* **16**: 760–772.
- Chen, L.J., Xiang, H.Z., Miao, Y., Zhang, L., Guo, Z.F., Zhao, X.H., *et al.* (2014) An Overview of Cold Resistance in Plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* **200**: 237–245.
- Chu, D.S., Pishvaei, B., and Payne, G.S. (1996) The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 33123–33130.
- Collander, R. (1933) Ernst Overton. *Protoplasma* **20**: 228–231.
- Cucu, B., Degreif, D., Bertl, A., and Thiel, G. (2017) Vesicle fusion and fission in plants and yeast. *Cell Calcium* **67**: 40–45.
- Danielli, J.F., and Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Physiol* **5**: 495–508.
- Darios, F., and Davletov, B. (2006) Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* **440**: 813–817.
- Degreif, D. (2014) Manipulation der Membranzusammensetzung von *S. cerevisiae*. *Masterarbeit, TU Darmstadt* 1–158.
- Degreif, D. (2018) Metabolic engineering approaches reveal widespread physiological functions of lipids for *Saccharomyces cerevisiae*. *Doktorarbeit* 1–188.
- Degreif, D., de Rond, T., Bertl, A., Keasling, J.D., and Budin, I. (2017) Lipid engineering reveals regulatory roles for membrane fluidity in yeast flocculation and oxygen-limited growth. *Metab Eng* **41**: 46–56.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**: 857–902.
- Dutrochet, H. (1826) *L'agent immédiat du mouvement vital dans sa nature et dans son mode d'action, chez les végétaux et les animaux*. J.-B. Baillière, Libraire, Paris.
- Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., and Lin, J. (2015) Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci* **20**: 388–397.
- Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D.L., and Friant, S. (2015) Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci* **16**: 1509–1525.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T., and Walz, T. (2004) Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**: 573–579.
- Frye, L.D., and Edidin, M. (1970) The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse-Human Heterokaryons. *Journal of Cell Science* **7**: 319–335.
- Gardocki, M.E., Jani, N., and Lopes, J.M. (2005) Phosphatidylinositol biosynthesis: biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1735**: 89–100.

- Gaspar, M.L., Aregullin, M.A., Jesch, S.A., Nunez, L.R., Villa-García, M., and Henry, S.A. (2007) The emergence of yeast lipidomics. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 241–254.
- Gauthier, N.C., Masters, T.A., and Sheetz, M.P. (2012) Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends in Cell Biology* **22**: 527–535.
- Goode, B.L., Eskin, J.A., and Wendland, B. (2015) Actin and endocytosis in budding yeast. *Genetics* **199**: 315–358.
- Gorter, E., and Grendel, F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med* **41**: 439–443.
- Greene, B., Liu, S.H., Wilde, A., and Brodsky, F.M. (2000) Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic* **1**: 69–75.
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., et al. (2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* **183**: 1075–1088.
- Grote, E., Carr, C.M., and Novick, P.J. (2000) Ordering the final events in yeast exocytosis. *J Cell Biol* **151**: 439–452.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999) The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J* **18**: 1071–1080.
- Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M.R., and Kung, C. (1986) Ion channels in yeast. *Science* **233**: 1195–1197.
- Haar, ter, E., Harrison, S.C., and Kirchhausen, T. (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1096–1100.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85–100.
- Harsay, E., and Bretscher, A. (1995) Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**: 297–310.
- Harsay, E., and Schekman, R. (2002) A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* **156**: 271–285.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol (Lond)* **117**: 500–544.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., and B, K. (1949) Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* **3**: 129–150.
- Huang, K.M., Gullberg, L., Nelson, K.K., Stefan, C.J., Blumer, K., and Lemmon, S.K. (1997) Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *Journal of Cell Science* **110** ( Pt 7): 899–910.
- Jackson, C.L., Konopka, J.B., and Hartwell, L.H. (1991) *S. cerevisiae* alpha pheromone receptors activate a novel signal transduction pathway for mating partner discrimination. *Cell* **67**: 389–402.



- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2005) Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43–51.
- Kabeche, R., Howard, L., and Moseley, J.B. (2015) Eisosomes provide membrane reservoirs for rapid expansion of the yeast plasma membrane. *Journal of Cell Science* **128**: 4057–4062.
- Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**: 475–487.
- Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**: 699–727.
- Krtková, J., Havelková, L., Křepelová, A., Fišer, R., Vosolsobě, S., Novotná, Z., *et al.* (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **60**: 88–97.
- Lees, N.D., Bard, M., Kemple, M.D., Haak, R.A., and Kleinhans, F.W. (1979) ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim Biophys Acta* **553**: 469–475.
- Li, L.B., Vorobyov, I., and Allen, T.W. (2012) The role of membrane thickness in charged protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* **1818**: 135–145.
- Lu, R., Drubin, D.G., and Sun, Y. (2016) Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance. *Journal of Cell Science* **129**: 1531–1536.
- Mahoney, E.M., Hamill, A.L., Scott, W.A., and Cohn, Z.A. (1977) Response of endocytosis to altered fatty acyl composition of macrophage phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 4895–4899.
- Malinsky, J., Opekarová, M., and Tanner, W. (2010) The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast* **27**: 473–478.
- Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X.L., Culbertson, M., Bussey, H., and Kung, C. (1990) Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6228–6232.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 603–612.
- Moran, N., Ehrenstein, G., Iwasa, K., Bare, C., and Mischke, C. (1984) Ion channels in plasmalemma of wheat protoplasts. *Science* **226**: 835–838.
- Moreira, K.E., Walther, T.C., Aguilar, P.S., and Walter, P. (2009) Pil1 controls eisosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **20**: 809–818.
- Munn, A.L. (2001) Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1535**: 236–257.
- Neher, E., and Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6712–6716.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799–802.

Newpher, T.M., and Lemmon, S.K. (2006) Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* **7**: 574–588.

Newpher, T.M., Idrissi, F.-Z., Geli, M.I., and Lemmon, S.K. (2006) Novel function of clathrin light chain in promoting endocytic vesicle formation. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 4343–4352.

Newpher, T.M., Smith, R.P., Lemmon, V., and Lemmon, S.K. (2005) In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Developmental Cell* **9**: 87–98.

Nishimura, S., Tokukura, M., Ochi, J., Yoshida, M., and Kakeya, H. (2014) Balance between exocytosis and endocytosis determines the efficacy of sterol-targeting antibiotics. *Chemistry & Biology* **21**: 1690–1699.

Novick, P., Ferro, S., and Schekman, R. (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**: 461–469.

Novotná, D., Flegelová, H., and Janderová, B. (2004) Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**: 803–813.

Osterhout, W.J.V. (1936) Electrical Phenomena In Large Plant Cells. *Physiological Reviews* **16**: 216–237.

Payne, G.S., and Schekman, R. (1985) A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science* **230**: 1009–1014.

Pfeffer, W. (1877) *Osmotische Untersuchungen: Studien zur Zellmechanik*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Prosser, D.C., Drivas, T.G., Maldonado-Báez, L., and Wendland, B. (2011) Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol* **195**: 657–671.

Prosser, D.C., Pannunzio, A.E., Brodsky, J.L., Thorner, J., Wendland, B., and O'Donnell, A.F. (2015)  $\alpha$ -Arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science* **128**: 4220–4234.

Rooij, I.I.S.D., Allwood, E.G., Aghamohammadzadeh, S., Hettema, E.H., Goldberg, M.W., and Ayscough, K.R. (2010) A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *Journal of Cell Science* **123**: 3496–3506.

Routaboul, J.-M., Fischer, S.F., and Browse, J. (2000) Trienoic Fatty Acids Are Required to Maintain Chloroplast Function at Low Temperatures. *Plant Physiol* **124**: 1697–1705.

Rowghanian, P., and Campàs, O. (2017) Non-equilibrium Membrane Homeostasis in Expanding Cellular Domains. *Biophys J* **113**: 132–137.

Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**: 511–548.

Schroeder, J.I., Hedrich, R., and Fernandez, J.M. (1984) Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**: 361–362.

- Silveira, L.A., Wong, D.H., Masiarz, F.R., and Schekman, R. (1990) Yeast clathrin has a distinctive light chain that is important for cell growth. *J Cell Biol* **111**: 1437–1449.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197–6202.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**: 720–731.
- Smindak, R.J., Heckle, L.A., Chittari, S.S., Hand, M.A., Hyatt, D.M., Mantus, G.E., *et al.* (2017) Lipid-dependent regulation of exocytosis in *S. cerevisiae* by OSBP homolog (Osh) 4. *Journal of Cell Science* **130**: 3891–3906.
- Spalding, E.P., Slayman, C.L., Goldsmith, M.H., Gradmann, D., and Bertl, A. (1992) Ion channels in Arabidopsis plasma membrane : transport characteristics and involvement in light-induced voltage changes. *Plant Physiol* **99**: 96–102.
- Strádalová, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazíková, M., Rachel, R., Tanner, W., and Malinsky, J. (2009) Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of Cell Science* **122**: 2887–2894.
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H., and McGraw, T.E. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6775–6780.
- TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P. (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 6483–6494.
- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **59**: 304–322.
- van Meer, G. (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 247–275.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112–124.
- Vida, T.A., and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**: 779–792.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., and Walter, P. (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**: 998–1003.
- Weinberg, J., and Drubin, D.G. (2012) Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends in Cell Biology* **22**: 1–13.
- Wolfe, J., and Steponkus, P.L. (1983) Mechanical properties of the plasma membrane of isolated plant protoplasts : mechanism of hyperosmotic and extracellular freezing injury. *Plant Physiol* **71**: 276–285.
- Ybe, J.A., Greene, B., Liu, S.H., Pley, U., Parham, P., and Brodsky, F.M. (1998) Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *EMBO J* **17**: 1297–1303.
- Yetukuri, L., Katajamaa, M., Medina-Gomez, G., Seppänen-Laakso, T., Vidal-Puig, A., and Oresic, M. (2007) Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Syst Biol* **1**: 1

## 7. ANHANG

### 7.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Membranmodelle im Wandel der Zeit .....	6
Abb. 2:	Grafische Repräsentation der verschiedenen intrazellulären Membran(protein)-Transportwege in der Bäckerhefe .....	10
Abb. 3:	Model der Clathrin-vermittelte Endocytose in der Bäckerhefe .....	11
Abb. 4:	Schematische Darstellung von Clathrin .....	13
Abb. 5:	Modellvorstellung des sekretorischen Wegs in der Bäckerhefe .....	14
Abb. 6:	Minimales Ersatzschaltbild einer biologischen Membran .....	15
Abb. 7:	Schematische Darstellung einer Patch-Clamp-Ableitung an einer Zelle....	18
Abb. 8:	Prinzip der Kapazitätsmessung an biologischen Membranen .....	20
Abb. 9:	Schematische Darstellung der FM4-64 Internalisierung in Hefe .....	28
Abb. 10:	Schematische Darstellung zur Untersuchung funktionaler Exocytose mittels Tok1-GFP.....	29
Abb. 11:	Beispiel einer Patch-Clamp Ableitung mit Testpuls und endocytotischem Ereignis .....	30
Abb. 12:	Energieabhängiges Wachstum von Hefeprotoplasten .....	33
Abb. 13:	Exocytose und Endocytose in Hefeprotoplasten .....	34
Abb. 14:	Markierung der Zellkerne durch Nup49p-GFP Fusionskonstrukte .....	35
Abb. 15	Elektrophysiologische Ableitung von Kapazitätsänderungen in Wildtyp-Hefeprotoplasten .....	37
Abb. 16:	Wachstum von Wildtyp und Clathrin-Deletionsmutanten in Flüssigkultur..	39
Abb. 17:	Mikroskopische Aufnahmen von intakten Zellen von Wildtyp (BY4741) und isogenen Clathrin-Deletionsmutanten ( $\Delta chc1$ und $\Delta clc1$ ) .....	40
Abb. 18:	Wachstum von Protoplasten aus Wildtypzellen und Zellen der Clathrin-Deletionsmutanten $\Delta clc1$ und $\Delta chc1$ .....	41
Abb. 19:	Fluoreszenzoptische und elektrophysiologische Untersuchung von Exocytose und Endocytose in WT, $\Delta clc1$ und $\Delta chc1$ .....	42
Abb. 20:	Killertoxin K1 wird in Killer-sensitiven Hefezellen möglicherweise durch Endocytose internalisiert .....	44

Abb. 21:	Anteil der einfach-ungesättigten Fettsäuren im Hefestamm BCY1 (BY4742 <i>ole1::P<sub>MET3</sub>-OLE1</i> ) in Abhängigkeit der Methioninkonzentration.	45
Abb. 22:	Einfluss der <i>OLE1</i> -Expression auf die exocytotische und endocytotische Aktivität in Hefeprotoplasten .....	47
Abb. 23:	Einfluss von MUFA-Anteil auf die Exocytose und Endocytose in Hefeprotoplasten .....	48
Abb. 24:	Einfluss der <i>ERG9</i> -Expression auf die exocytotische und endocytotische Aktivität in Hefeprotoplasten .....	50
Abb. 25:	Einfluss des Sterolgehalts auf die Exocytose und Endocytose in Hefeprotoplasten .....	51
Abb. 26:	Eisosomen in intakte Zellen und Protoplasten von Wildtyphefe (BY4742).	54
Abb. 27:	Plasmidkarte von pGREG576 .....	70
Abb. 28:	Plasmidkarte von pGREG600 .....	73

## 7.2. ORF- UND PLASMID-SEQUENZEN, PLASMIDKARTEN

Die pGREG-Plasmide und die entsprechende Klonierung mittels Homologer Recombination in Hefe wurden von Jansen et al. beschrieben (Jansen *et al.*, 2005). Die DNA Sequenzen der Plasmide sind bei Euroscarf ([www.euroscarf.de](http://www.euroscarf.de)) hinterlegt. Die Sequenzen für die ORFs (*TOK1* und *NUP1*) sind von der *Saccharomyces* Genome Database. Plasmidkarten wurden mit SnapGene Viewer erstellt.

### 7.2.1. Sequenz und Plasmidkarte von pGREG576

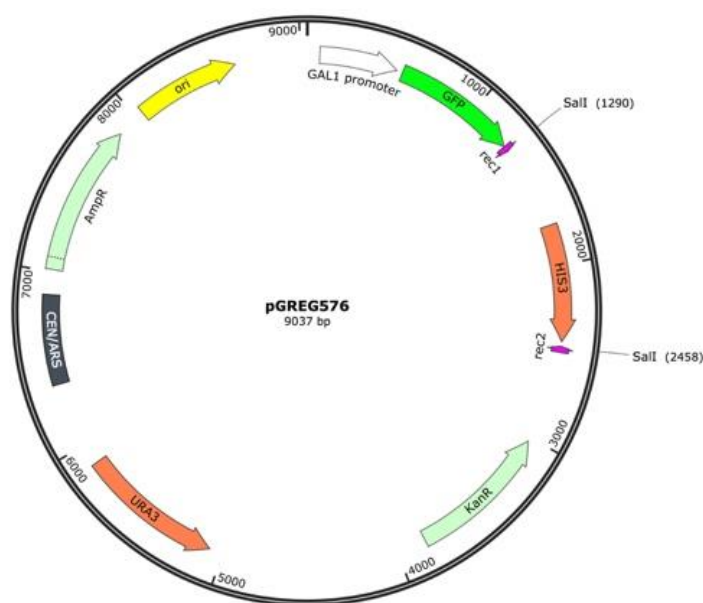
#### Sequenz von pGREG576

Die Rekombinations-Sequenzen sind unterstrichen. Die Sall-Schnittstellen sind gelb unterlegt.

```
TTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCGCGCCTAGTACGGATTAGAAGCCGCCGA
GCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTACCGGTGCGGTTCCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGC
ACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAA
TGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTT
TGATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAA
ATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGATTCTAGAGCGGCCGCACT
AGTATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCA
GTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAGAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAACT
TGTCCTACTTTTCACTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAA
GGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTCAAAGATGACGGAACACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTGAAGGTGATACCTTGTGTA
ATAGAATCGAGTTAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATAACTCACACAATGTATA
CATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCAT
TATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCCTTTACCAGACAACCATACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTGAAAGATCCCA
ACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTCTTCTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAATATACAAGAATTCGATATC
AAGCTTATCGATACCGTTCGACGTCTATGGATCCGCTGCACGGTCTGTTCCCTAGCATGTACGTGAGCGTATTTCCCTTTTAAACCACGAC
GCTTTGTCTTCATTCAACGTTTCCATTGTTTTTTCTACTATTGCTTTGCTGTGGGAAAACTTATCGAAAGATGACGACTTTTTCTTAA
TTCTCGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTTGAACACGGCATTAGTCAGGGAAGTCATAACACAGTCCTT
TCCCGCAATTTTCTTTTCTATTACTCTTGGCCTCCTCTAGTACACTCTATATTTTTTTATGCCTCGGTAATGATTTTCATTTTTTTTTT
CCACCTAGCGGATGACTCTTTTTTTTCTTAGCGATTGGCATTATCACATAATGAATTATACATTATATAAAGTAATGTGATTTCTTCGAA
GAATATACTAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAGATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAAATGAAACCAAG
ATTCAGATTGCGATCTCTTTAAAGGGTGGTCCCTTAGCGATAGAGCACTCGATCTCCCAGAAAAAGAGGCAGAAGCAGTAGCAGAACAGG
CCACACAATCGCAAGTGATTAACGTCCACACAGGTATAGGGTTTCTGGACCATATGATACATGCTCTGGCCAAGCATTCGGCTGGTCTGCT
AATCGTTGAGTGCAATTGGTGACTTACACATAGACGACCATCACACCACTGAAGACTGCGGGATTGCTCTCGGTCAAGCTTTTAAAGAGGCC
CTACTGGCGCGTGGAGTAAAAAGGTTTGGATCAGGATTGCGCCTTTGGATGAGGCACCTTCCAGAGCGGTGGTAGATCTTTCGAACAGGC
CGTACGCAGTTGTGCAACTTGGTTTGCAAAGGGAGAAAGTAGGAGATCTCTCTTGCAGAGATGATCCGCATTTTCTTGAAGCTTTGCAGA
GGCTAGCAGAATTACCTCCACGTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATGATCATCACCGTAGTGAGAGTGCGTTCAAGGCTCTTGGCGTTGCC
ATAAGAGAAGCCACCTCGCCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAAGGTGTTCTTATGTAGTGACACCGATTATTTAAAGCTGCAG
GTTCGACCTCGAGTCATGTAATTAGTTATGTACGCTTACATTACGCCCTCCCCCAGATCCGCTCTAACGAAAAGGAAGGAGTTAGACA
ACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTAC
AGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCGGTACCTAA
TAACCTCGTATAGCATACTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCTCGACGTTTTTCGACACTGGATGGCGCGTTAGTATCGAATCGACAGC
AGTATAGCGACCAGCATTACATACGATTGACGCATGATATTACTTCTGCGCACTTAACCTCGCATCTGGGCAGATGATGTCGAGGCGAA
AAAAAATATAAATCAGCTAACATTGATTAAAAATAGAACAACTACAATATAAAAAAATATACAAATGACAAGTTCTTGAACAAAGAAT
CTTTTTATTGTCTAGTACTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTT
```

GAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG  
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAG  
AATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGT  
TATTCATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGCGCAG  
GAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTGCCGGGGATCGCAGTGGTG  
AGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCAT  
CTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACC  
TGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCTCGAAACGTGAGTCTTT  
TCCTTACCCATGGTTGTTTTATGTTTCGGATGTGATGTGAGAACTGTATCCTAGCAAGATTTTAAAGGAAGTATATGAAAGAAGAACCTCAG  
TGGCAATCCTAACCTTTTATATTTCTCTACAGGGGCGCGCGTGGGACAATTCAACGCGTCTGTGAGGGGAGCGTTTCCCTGCTCGCAG  
GTCTGCAGCGAGGAGCCGTAATTTTGTCTCGCGCCGTGCGGCCATCAAAATGTATGGATGCAAATGATTATACATGGGGATGTATGGGCT  
AAATGTACGGGCGACAGTCACATCATGCCCTGAGCTGCGCACGTCAAGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCCTCATGTCGCTGGCCGG  
GTGACCCGCGGGGACGAGCAAGCTAAACAGATCTCTAGACCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTGT  
CTTAATTAAGGGTACCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC  
TGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA  
CAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCG  
CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCGCCGTCAAGCTCTAAA  
TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCA  
TCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAAGTGAACAACACTCAACC  
CTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC  
GAATTTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATAGGGTAAT  
AACTGATATAATTAATTAAGCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTTAGTTTTGTGCGCGCATC  
TTCTCAAATATGCTTCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTACCCCTCTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAATAGCTCTTCCAACAAT  
AATAATGTGAGATCCTGTAGAGACCACATCATCCACGGTTCTATACTGTTGACCCATGCGTCTCCCTTGTCTATTAACCCACACCGGGT  
GTCATAATCAACCAATCGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAACAAAACTTTGTGCTCTCTTCGCAA  
TGTCACAGTACCCTTAGTATATTTCTCCAGTAGATAGGGAGCCCTGTCATGACAATTCTGCTAACATCAAAAGGCCCTCTAGGTTCTTTGT  
TACTTCTTCTGCGCCTGCTTCAACCGCTAACAAATACCTGGGCCACCACACCGGTGTCATTCGTAATGTCTGCCATTCTGCTATTCTG  
TATACACCCGAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTGAGCAAAATTTTCTGTCTTGAAGAGTAAAAAATGTACTTGGCGGATA  
ATGCCTTTAGCGGCTTAAGTGTGCCCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTTTTAGTAAACAAATTTTGGACCTAATGC  
TTCAACTAACTCCAGTAATTCCTTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTTGTGTTTTGCTGTCATGATATTAATAGCTTG  
GCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCAGTTCCTTATATGTAGCTTTTCGACATGATTTATCTTCGTTTTCTGCAAGTTTGTCTGT  
GCAGTTGGGTTAAGAATACTGGGCAATTTTCATGTTTCTTCAACACTACATATGCGTATATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCCTTCG  
TTCTTCTTCTGTTCGGAGATTACGAATCAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAAATGATGAATTGAAT  
TGAAAAGCTGTGGTATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACG  
CGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTC  
ATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGGTTTCTTAGGACGGATCG  
CTTGCTGTAACTTACACGCGCCTCGTATCTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTATGTTTTGTATT  
TGGATTTTAGAAAGTAAATAAAGAGGTAGAAGAGTTACGGAATGAAGAAAAAATAAACAAAGGTTTAAAAATTTCAACAAAAAGCG  
TACTTTACATATATATTTATAGACAAGAAAAGCAGATTAATAGATATACATTCGATTAACGATAAGTAAATGTAAATCACAGGATTT  
TCGTGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTGAGAGCAGGAAGAGCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGG  
CGATCCCCCTAGAGTCTTTTACATCTTCGGAAAACAAAACCTATTTTCTTAAATTTCTTTTTTACTTTCTATTTTAAATTTATATATT  
TATATTAAAAAATTTAAATTATAATTATTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCC  
TATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG  
AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGA  
AAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCC  
CGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT  
CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTCAAGAAAAGCATCTTACGATGGCATGACAGTAAGAAATTAT  
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA  
CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCT  
GTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGG  
ATAAAGTTGACAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG  
TATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAT

AGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAC  
TTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGC  
GTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTA  
CCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCC  
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGC  
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCG  
TGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA  
GAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAG  
TCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGTATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCG  
GCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG  
CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAA  
ACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT  
AATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCCTATGTTGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGA



**Abbildung 27: Plasmidkarte von pGREG576**

Plasmidkarte von pGREG576 mit den relevanten Elementen. pGREG576 dient zur Klonierung und N-terminaler Markierung der Inserts. Die Klonierung erfolgt durch Linearisierung des Plasmids mittels Sall, wodurch der *HIS3*-Marker entfernt. Einsetzen eines Inserts wird nachfolgend durch HR unter Nutzung der Rekombinationssequenzen *rec1* und *rec2* (pinke Pfeile).

## 7.2.2. SEQUENZ UND PLASMIDKARTE VON pGREG600

### Sequenz von pGREG600

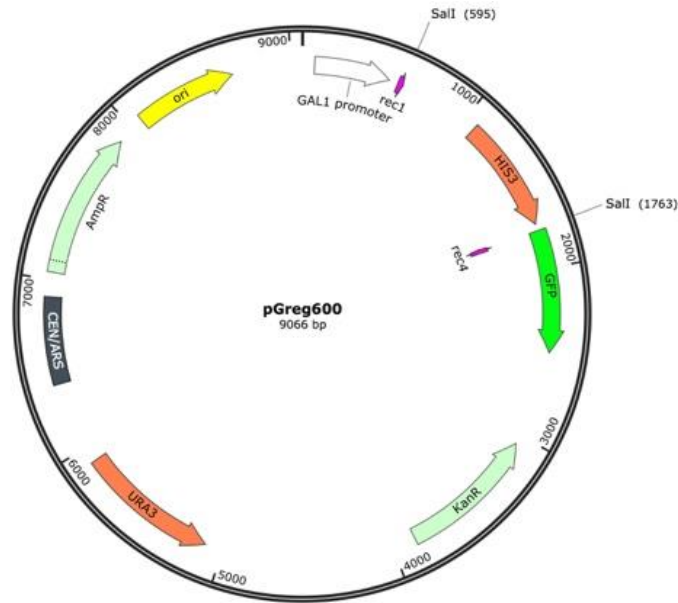
Die Rekombinations-Sequenzen sind unterstrichen. Die Sall-Schnittstellen sind gelb unterlegt.

TTACGCCAAGCGCGCAATTAAACCTCACTAAAGGGAACAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCGCGCCTAGTACGGATTAGAAGCCGCCGA  
GCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTACCAGGTCGCGTTCCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGC  
ACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAA  
TGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTATGCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTT  
TGATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAA  
ATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAAGTCAAGGAGAAAAACCCCGATTCTAGAGCGGCCGCACT  
AGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTGCACGTCATATGGATCCGCTGCACGGTCTGTCCCTAGCA



TGTACGTGAGCGTATTTCTTTTAAACCACGACGCTTTGTCTTCATTCAACGTTTCCCATTGTTTTTTTCTACTATTGCTTTGCTGTGGGA  
AAAACCTATCGAAAGATGACGACTTTTTCTTAATTCCTGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTTGAACAC  
GGCATTAGTCAGGGAAGTCATAACACAGTCTTTCCCGCAATTTTCTTTTCTATTACTCTTGGCCTCCTCTAGTACACTCTATATTTTTT  
TATGCCTCGGTAATGATTTTTCATTTTTTTTTTTCCACCTAGCGGATGACTCTTTTTTTTTTCTTAGCGATTGGCATTATCACATAATGAATT  
ATACATTATATAAAGTAATGTGATTCTTCGAAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAAGATGACAGAGCAGAAA  
GCCCTAGTAAAGCGTATTACAAATGAAACCAAGATTGAGATTGCGATCTCTTTAAAGGGTGGTCCCCTAGCGATAGAGCACTCGATCTTCC  
CAGAAAAAGAGGCAGAAGCAGTAGCAGAACAGGCCACACAATCGCAAGTGATTAACGTCCACACAGGTATAGGGTTTCTGGACCATATGAT  
ACATGCTCTGGCCAGCATTCCGGCTGGTCGCTAATCGTTGAGTGCATTGGTGACTTACACATAGACGACCATCACACCACTGAAGACTGC  
GGGATTGCTCTCGGTCAAGCTTTTTAAAGAGGCCCTACTGGCGCGTGGAGTAAAAAGGTTTGGATCAGGATTTGCGCCTTTGGATGAGGCAC  
TTTCAGAGCGGTGGTAGATCTTTTGAACAGGCCGTACGAGTTGTGCAACTTGGTTTGCAAAGGAGAAAGTAGGAGATCTCTCTTGCGA  
GATGATCCCGCATTTTCTTGAAAGCTTTCAGAGGCTAGCAGAATTACCTCCACGTTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATGATCATCACCGT  
AGTGAGAGTGCCTTCAAGGCTCTTGGCGTTGCCATAAGAGAAGCCACCTCGCCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAAGGTGTTT  
TTATGTAGTGACACCGATTATTTAAAGCTGCAGGTGACCTCGAGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTCT  
GTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCTAGTGAGAGGGTGAAAGTGATGCAACATACGGAACCTTACCCTTAAAT  
TTATTTGCACTACTGGAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGA  
TCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAGATGACGGGAACCTAC  
AAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTC  
TTGGACACAAATTGAATACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAAT  
TAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGAC  
AACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAAACAGTGTCTG  
GGATTACACATGGCATGGATGAACATAACAATAACTCGAGTCATGTAATTAGTTATGTACGCTTACATTACGCCCCCCCCACATCC  
GCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTA  
TATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTC  
GAAGGCTTTAATTTGCGGCCGTACCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCTCGACGTTTTTCGACACTG  
GATGGCGCGGTTAGTATCGAATCGACAGCAGTATAGCGACCAGCATTACATACGATTGACGCATGATATTACTTTCTGCGCACTTAACTT  
CGCATCTGGGCAGATGATGTCGAGGCGAAAAAATAAATACAGCTAACATTTGATTAAATAGAACAACTACAATATAAAAAAACTAT  
ACAAATGACAAGTTCTTGAAACAAGAATCTTTTTATTGTGCACTGATGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATT  
CATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGA  
TCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAAATTTCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATCAAGTGAGAAAT  
CACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC  
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAATTA  
CAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGA  
ATGCTGTTTTTGCCGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTGGGAAGAGGCATAAATTC  
CGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTTGGCGCATCGGGC  
TTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAAT  
TTAATCGCGGCTCGAAACGTGAGTCTTTTCTTACCATGGTTGTTTATGTTTCGGATGTGATGTGAGAACTGTATCCTAGCAAGATTTTA  
AAAGGAAGTATATGAAAGAAGAACCTCAGTGGCAAATCCTAACCTTTTATATTTCTCTACAGGGCGCGCGTGGGACAATTCAACGCGT  
CTGTGAGGGGAGCGTTTCCCTGCTCGCAGGTCTGCAGCGAGGAGCCGTAATTTTTGCTTCGCGCGGTGCGGCCATCAAAATGTATGGATGC  
AAATGATTATACATGGGGATGTATGGGCTAAATGTACGGGCGACAGTCACATCATGCCCCTGAGCTGCGCACGTCAAGACTGTCAAGGAGG  
GTATTCTGGGCCCTCATGTGCTGGCCGGGTGACCCGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTCTAGACCTAATAACTTCGTATAGCAT  
ACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTGTCTTAATTAAGGGTACCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTC  
GTTTTACAACGTCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG  
AAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGC  
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACG  
TTCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAAGTTG  
ATTAGGGTGATGGTTACGATAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACT  
CTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGCCCTATTGGTTAAAA  
AATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCT  
GTGCGGTATTTACACCGCATAGGGTAATAACTGATATAATTAATTAAGAGTCTAATTTGTGAGTTAGTATACATGCATTTACTTATAA  
TACAGTTTTTTAGTTTTGTGGCCGCATCTTCTCAAATATGCTTCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTACCCCTCTACCTTAGCATCCCTT  
CCCTTTGCAATAGTCTCTTCCAACAATAATAATGTGAGATCCTGTAGAGACCACATCATCCACGGTCTATACCTGTTGACCCAATGCGT  
CTCCCTTGTCTCTAAACCCACACCGGGTGTCTAATCAACCAATCGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTGAGCAATAAAGCC

GATAACAAAATCTTTGTGCTCTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATATTCTCCAGTAGATAGGGAGCCCTTGCAATGACAATTCTGCT  
AACATCAAAAGGCCCTCTAGGTTCCCTTGTACTTCTTCTGCCGCTGCTTCAAACCGCTAACAAATACCTGGGCCCCACCACACCGTGTGCAT  
TCGTAATGTCTGCCCATTCTGCTATTCTGTATACACCCGAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTCAGCAAATTTCTGTCTTC  
GAAGAGTAAAAAATTGTACTTGGCGGATAATGCCTTTAGCGGCTTAACTGTGCCCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTT  
TTTAGTAAACAAAATTTGGGACCTAATGCTTCAACTAACCAGTAATTCCTTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTGT  
GCTTTTCGTGCATGATATTAAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCCCTATATGTAGCTTTCGACATGATTTA  
TCTTCGTTTCCTGCAGGTTTTTGTCTGTGCAGTTGGGTTAAGAATACTGGGCAATTTTCATGTTTCTTCAACACTACATATGCGTATATAT  
ACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCCTTCGTTCTTCTCTGTTTCGGAGATTACCGAATCAAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAA  
AAGAATAAAAAAATGATGAATTGAATTGAAAAGCTGTGGTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCA  
GCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG  
AGCTGCATGTGTGAGGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCA  
TGATAATAATGGTTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCTGTAACTTACACGCGCCTCGTATCTTTAATGATGAATAATTTGGGAATTTACTC  
TGTGTTTATTTATTTTATGTTTGTATTTGGATTTTAGAAAGTAAATAAAGAAGGTAGAAGAGTTACGGAATGAAGAAAAAATAAAC  
AAAGGTTTAAAAAATTTCAACAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACATTCGATTAAC  
GATAAGTAAAATGTAATACACAGGATTTTCGTGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAAATACCTGAGAGCAGGA  
AGAGCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTTACATCTTCGGAACAAAAAATATTTTTCTTTAATTTCTTT  
TTTTACTTTCTATTTTAAATTTATATATTTATATTAATAAATTTAAATTATAATTTTATATAGCAGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGC  
ACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGAT  
AAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCC  
TGTTTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAAC  
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCC  
GTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCT  
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATTAATCTGACAACGATCGGA  
GGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAC  
CAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG  
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAA  
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG  
GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAAGTGTGACACCAAGTTA  
CTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC  
CCTTAACGTGAGTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCT  
GCTGCTTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGCTT  
CAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC  
GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG  
CGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCT  
ATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT  
CCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGC  
GGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTGACATGTTCTTCTGCGTTATC  
CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGGAGTCAGTGAGC  
GAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACT  
GGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCTAT  
GTTGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGA



**Abbildung 28: Plasmidkarte von pGREG600**

Plasmidkarte von pGREG576 mit den relevanten Elementen. pGREG576 dient zur Klonierung und C-terminaler Markierung der Inserts. Die Klonierung erfolgt durch Linearisierung des Plasmids mittels SalI, wodurch der *HIS3*-Marker entfernt. Einsetzen eines Inserts wird nachfolgend durch HR unter Nutzung der Rekombinationssequenzen *rec1* und *rec2* (pinke Pfeile).

### 7.2.3. SEQUENZ VON *TOK1* (TANDEM PORE OUTWARD RECTIFYING $K^+$ -CHANNEL 1)

ATGACAAGGTTTCATGAACAGCTTTGCCAAACAAACGCTGGGATATGGCAATATGGCGACAGTGAGCAAGAGAGCTCAGCTCAGGCTGTTG  
 ATTCTCATTCAAACAACACACCGAAGCAAGCTAAGGGTGTCTTGACAGAGAACTAAAGGATGCATTGCGGTTCCGGGACGAAAGAGTTAG  
 TATTATTAATGCAGAGCCTTCTTCAACACTGTTTCGTCTTTTGGTTTGTGGTTTCATGCTATTTCCCTGTGATTACTGCCTGCTTGGGTCCC  
 GTAGCTAACACTATCTCGATAGCCTGTGTAGTTGAAAAATGGAGATCCTTAAAGAACAACCCGTGGTGACAAATCCACGAAGCAATGACA  
 CCGATGTTTTGATGAATCAAGTAAGACAGTTTTTGTATCCTCGGTATTTTGGCGTTAATATCATCTCTTTGGTACTGGGTTTTACGTC  
 AAATATTATACTAATGCTACATTTTCAGTAAGAAGTTGACGTATCTTAAATCTCAGTTAATAAATATAACAGGATGGACAATAGCTGGAGGG  
 ATGCTTTTGGTGGACGTGATTGTATGCTCCTTGAATGACATGCCCAGCATCTACAGTAAGACTATCGGATTTTGGTTTGCCTGTATCAGTT  
 CTGGTCTATATTTGGTATGCACCATATTTTAACAATACATTTTATGGATATAAATTAGGAAAATATCCTCCAACGTTCAACCTTTTGCC  
 CAATGAAAGAAGTATCATGGCATACTGTACTATTGTCTTTATGGTTGATTTGGGGTGCGGGTATGTTTAGCGGTTTATTCACATCACT  
 TACGGAATGCATTATATTTCTGCACGGTATCATTATTAACCGTGGGACTAGGTGACATCCTGCCCAAGTCGGTTGGCGCCAAAATCATGG  
 TTTTAATCTTTTCGCTATCTGGTGTGTCTTGATGGGTTAATAGTGTATGACAAGATCCATCATTCAAAAGTCCTCTGGCCCAATTTT  
 CTTTTTCCACAGAGTTGAAAAGGCAGGTCCAAATCGTGGAACATTATATGGATAGTAGTAAAAATTTATCTGAAAGGGAAGCGTTCGAC  
 TTAATGAAGTGTATCCGACAAACGGCCTCAAGGAAGCAGCATTGGTTTTCTTTGTCTGGTGACTATTGCAATTTTCATGGCTTTTGGTTAT  
 TGGGAGCTCTGTATTCAAATTCGCAGAAAATTTGGTCTGCTTCAATTGTATTTACTTTTGTCTTGTGCTTATTAACCATTGGATACGG  
 AGACTATGCTCCAAGGACTGGTGCAGGCCGTGCTTTTTTGTGATTTGGGCGTTGGGAGCCGTGCCATTAATGGGGGCTATCCTATCTACA  
 GTCGGTGATCTGTTGTTTGACATTTCCACTTCTCTGGATATTAAGATCGGTGAATCATCAATAATAAAGTCAAGTCCATCGTTTTTAATG  
 GCGTCAAGAGCACTTTCTTTATGGTGAACACTGGAGAAATTTTCAAGAATCTGACACAGCTGATGGTGATCTGGAAGAAAATACAAC  
 GAGCTCACAATCCAGTCAAATTTCTGAATCAACGATAATAATTCAGAAGAGAATGATTCGGAGTGACATCCCCTCCTGCAAGCCTGCAA  
 GAATCATTTTCTTCAATTATCAAAGCATCTAGCCCAGAGGAATACTTCTCTAGAAATATGTTTCTCTGCTGAATATGCACTACAGGACT  
 CGGGGACCTGTAATTTAAGGAACCTGCAAGAGCTACTTAAAGCCGTCAAAAACTACATCGGATATGTCTGGCGGATAAAGATTACACACT  
 TAGTTTTTCCGACTGGTCTGATCATTAATACTACATTTGAGGAACATTACAGATATTGAGGAGTACACACGCGGACCCGAATTTTGATA  
 TCACCTGATACGCCCCTCAAGTTCCCGTTAAATGAACCTCATTTTGTCTTTATGATGCTTTTCAAGAACATAGAAGAATTAGTTGGTAATC  
 TAGTAGAAGACGAAGAGCTTTATAAAGTTATAAGCAAAAGAAAATTTTGGGTGAGCATAGAAAGACACTTTGA

#### 7.2.4. SEQUENZ VON *NUP49* (*NUCLEAR PORE 49*)

ATGTTTGGATTAAATAAAGCATCTTCGACACCTGCAGGTGGGCTCTTTGGTCAGGCCAGCGAGCTAGCACTGGAAACGCGAATACTGGGT  
TTTCGTTTGGTGGGACTCAAACCTGGACAAAACACCGGCCAAGTACAGGTGGACTATTTGGCGCTAAACCAGCCGGATCTACAGGAGGATT  
AGGTGCATCATTTGGTCAGCAGCAACAACAATCTCAGACAAATGCATTTGGAGGAAGCGCCACCACCGGAGGGGGCCTTTTCGGTAACAAA  
CCTAACAAATACGGCGAACACTGGGGGCGGGTTATTTGGCGCTAATTCGAACAGTAATTCTGGCAGTTTGTGGTTCCAACAATGCACAGA  
CGAGTCGTGGTTTGTGGTAATAATAACACTAATAATATCAATAATAGTAGTAGTGGCATGAATAATGCAAGCGCTGGACTATTTGGCTC  
TAAACCTGCAGGAGGCACCTCTTTGTTTCGGTAATACAAGCACCTCTTCGGCCCTGCGCAGAACCAGGGCATGTTTGGTGCAAAACCAGCT  
GGTACATCTCTATTTCGGCAATAATGCAGGTAATACGACCCTGGTGGAGGGTTATTTGGCTCCAAACCGACAGGAGCAACGTCTTTGTTTG  
GTTTCATCAAATAACAACAATAACAATAATAGTAACAACATCATGAGTGCGTCAGGCGGGCTATTTGGTAATCAGCAGCAGCAACTGCA  
GCAACAACCACAAATGCAGTGCGCATTGCAAAATCTATCTCAGCTCCCTATTACCCCAATGACACGGATTTCCGAATTACCACCTCAAATA  
CGTCAAGAAATTGAACAACCTAGATCAATATATTCAAAAACAAGTGCAGATCTCGCACCATTTGAAGGCCGATACAATCGATCATGATGAAT  
TGATAGATTCCATTCCCTCGTGATGTTGCATACCTACTGAAGTCAGAATCTGCAACAAGTCAATATTTAAAGCAAGATTTGAAGAAAATATC  
CTCATTTAAATCGCTAATCGATGAGGACCTTCTAGACACGCAAACTTTTTCGGTGCTCTTACAGCAACTATTAACCTCCGGGAAGCAAAATT  
TCTTCTAATGACTTAGACAAATTTCTTTCAAAGAAAATTCATCTCTACGAGAAGAAGTTAGAGGATTACTGCCGTATTCTCTCTGATATAG  
AAACTGCGGTAAATGGCATTGATACAGATTTATTTGGCGCCCCAAATAACCCTAATTCTACAGCTATCAGCAGATCTAGGTTTCATCCGA  
AGCAGAGAACCTACTGCAGTTGAAGACAGGCTTAGCTGCCATAGTCTCTACTGTCTATTGAGGAATTCACACTGTTTATGGATATCGCTGAG  
AGAATCGCCGTGTTACATCAAAAACGAAAACACTGGCATCATTGAGCATATGA

### **7.3. EIGENANTEIL AN DER ARBEIT**

Abbildung 21 wurde von Daniel Degreif zur Verfügung gestellt. Abbildung 26 ist aus der Diplomarbeit von Chris Sprengel, die unter meiner Anleitung durchgeführt wurde. Alle anderen Experimente und Datenanalysen wurden von mir selbst durchgeführt.

#### 7.4. KONFERENZBEITRÄGE

##### Poster

27. International conference on yeast genetics and molecular biology, Levico Terme, Italien (2015)

**Cucu B**, Carillo L, Degreif D, Kohl M, Thiel G, Bertl A. 2015 The role of Clc1p and Chc1p in endocytosis/exocytosis in yeast. Yeast, 32 S116

58. Annual Meeting of the Biophysical Society, San Francisco, USA (2014)

Degreif D, **Cucu B**, Carrillo L, Peter M, Bertl A. Yeast Based Assays for Studying Function of TRPV1.

##### Vortrag

12. Levures, Modèles et Outils Meeting, Brüssel, Belgien (2016)

"Elementary processes of endo-/exocytosis in yeast studied by electrophysiological recording of membrane capacitance."

#### 7.5. EIGENE PUBLIKATIONEN

Carrillo L, **Cucu B**, Bandmann V, Homann U, Hertel B, Hillmer S, Thiel G, Bertl A. 2015. High-resolution membrane capacitance measurements for studying endocytosis and exocytosis in yeast. Traffic 16:760–772.

**Cucu B**, Degreif D, Bertl A, Thiel G. 2017. Vesicle fusion and fission in plants and yeast. Cell Calcium 67:40–45.

## 7.6. LEBENS LAUF

### Bayram Cucu

Geboren am 11.01.1984 in Siverek (Türkei)

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Verheiratet, 1 Tochter

Am Südbahnhof 9, 65604 Elz, Deutschland

## BERUF SERFAHRUNG

---

12/2016 – dato      **Globaler strategischer Produktmanager**, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, *Holzheim*

03/2014 – 02/2018      **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, TU Darmstadt, *Darmstadt*

## BILDUNG

---

03/2014 – 02/2018      **Technische Universität Darmstadt**, *Darmstadt*

- Doktorand, Fachbereich Biologie, Yeast Membrane Biology
- Teilnehmer am DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) geförderten Projekt “*Molecular mechanisms of endo- and exocytosis in budding yeast*”

10/2007 – 01/2014      **Technische Universität Darmstadt**, *Darmstadt*

- Diplom Biologe
- Titel der Diplomarbeit: “*Untersuchung zur Funktion von Killertoxinen in Saccharomyces cerevisiae*”

09/2004 – 06/2007      **Allgemeines Gymnasium Michelstadt**, *Michelstadt*

- Abitur

09/2002 – 08/2004      **Carl-Weyprecht-Schule**, *Bad König*

- Gesamtschule/Gymnasialzweig

09/1999 – 03/2002      **Erich-Kästner Schule**, *Darmstadt/Kranichstein*

- Gesamtschule/Gymnasialzweig

09/1997 – 08/1999      **Bernhard-Riemann Gymnasium**, *Scharnebeck*

- Gymnasium

### **7.7. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei Allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Vor allem bedanke ich mich bei Prof. Adam Bertl für die stetige Unterstützung und Motivation während des gesamten Studiums und der Promotion.

Herr Prof. Thiel danke ich für die Übernahme des Koreferats und die mir gegebenen Möglichkeiten in seinen Räumlichkeiten meine Messungen durchführen zu können.

Ein großes Dankeschön an Daniel D., Sebastian H. für die tolle Zeit im Labor.

Meiner Frau und meiner kleinen Biene Maya danke ich für die bedingungslose Unterstützung und Liebe.



### **7.8. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 07. Februar 2018

---

Bayram Cucu